UNIVERSITE DE PARIS
Année 1967

FACULTE DE PHARMACIE
Série E - N° 162

THESES
présentées
A LA FACULTE DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE DE PARIS
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)
par

Alain AMAR - COSTESEC
ancien Interne des Hôpitaux de Paris

1re thèse :

Recherches sur l'amine-oxydase et sur son rôle dans la manifestation de certaines potentialités toxiques

2e thèse :

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 20 décembre 1967

JURY : MM. TRUHAUT Président
COURTOIS
BOHUON Examinateurs

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534914_0009

UNIVERSITE DE PARIS
Année 1967

FACULTE DE PHARMACIE
Série E - N° 162

THESES
présentées
A LA FACULTE DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE DE PARIS
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Alain AMAR - COSTESEC
ancien Interne des Hôpitaux de Paris

1re thèse :

Recherches sur l'amine-oxydase et sur son rôle dans la manifestation de certaines potentialités toxiques

2e thèse :

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 20 décembre 1967

JURY : MM. TRUHAUT Président
COURTOIS
BOHUON Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Au moment de présenter ce mémoire, je tiens à exprimer mon respectueux attachement au Professeur P. DENOIX, Directeur de l'Institut Gustave-Roussy, où ce travail a été réalisé.

Le Professeur R. TRUHAUT m'a accueilli parmi ses élèves et m'a engagé dans ces investigations où la Biochimie offre des perspectives renouvelées à la science toxicologique. Il compte parmi les promoteurs de cette orientation de la Toxicologie moderne. Je tiens à lui dire toute ma gratitude et mon attachement.

Le Professeur J.E. COURTOIS est à l'origine de mon orientation vers la Biochimie. J'ai suivi avec un intérêt constant son enseignement enrichi de recherches personnelles et de contacts permanents avec tous les milieux scientifiques. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma gratitude.

J'ai eu le privilège d'être engagé dans les travaux de l'équipe que le Professeur C. BOHUON anime à l'Institut Gustave-Roussy. Il est l'instigateur et le directeur des recherches dont les résultats font l'objet de cette thèse. Qu'il veuille bien accepter ce témoignage de reconnaissance pour le soutien dont il m'a honoré.

Le Docteur O. SCHWEISGUTH m'a témoigné les marques de son amitié et de sa confiance. Qu'elle soit assurée de mon admiration, de mon attachement et de mon profond respect.

Mademoiselle E. BRAILLON a réalisé avec une remarquable compétence, une partie des expériences qui font la matière de ce travail. Je lui exprime ma gratitude et l'assure de mon amitié.

Je dois à mes Maîtres de la Faculté de Pharmacie et des Hôpitaux de Paris le meilleur de ma formation. Je les assure de ma reconnaissance.

A mes camarades de l'Unité de Biologie Clinique de l'Institut Gustave-Roussy, à mes collègues de l'Internat des Hôpitaux de Paris, ce témoignage d'amitié.

P E R S O N N E L D E L A F A C U L T E

D E P H A R M A C I E D E P A R I S

A D M I N I S T R A T I O N

MALANGEAU P. . . . . DOYEN,
GUILLOT M. . . . . Assesseur, O +
DELAVEAU P. . . . . Assesseur
RODINEAU L. . . . . Secrétaire Général, +
FERRARI (Mme S.) . . . . . Attaché Principale
JEANDEL L. . . . . Attaché,
ESPINASSE (Mme M.-L.) . . . . . Attaché,
BRENN A. . . . . Attaché, +
JACOB A. . . . . Attaché, +
MUR (Mme A.-M.) . . . . . Attaché,
FRIZOL (Mlle E.) . . . . . Attaché
TRICAN J. . . . . Attaché

P R O F E S S E U R S H O N O R A I R E S

LAUNOY L. . . . . O +,
FLEURY P. . . . . O +,
PICON M. . . . . O +,

P R O F E S S E U R S

JANOT M.-M., +, Membre de l'Institut.	Pharmacie Galénique (T)
VALETTE G., +	Pharmacodynamie (T)
PARIS R., +	Matière Médicale (T)
GUILLOT M., O +	Physique (T)
GAUTIER J.-A., O +	Chimie Organique (T)
LAMBIN (Mle S.) +	Microbiologie (T)
RAOUL Y., +	Physiologie (T)
COURTOIS J., +	Chimie Biologique (T)
DOMANGE L., O +	Chimie Générale et Minérale (T)
TRUHAUT R., O +	Toxicologie (T)
MORETTE A., +	Hydrologie (T)
CAVIER R., +	Parasitologie (T)
QUEVAUVILLER A., +	Hygiène et Education Sanitaire (T)
MOREAU R., +	Pharmacie Chimique (T)
GERMAN A.	Virologie et Sérologie(T)
PIETTE M., +	Biologie Sanguine, Hématologie (T)
MALANGEAU P.	Chimie Analytique (T)
GIRARD M., +	Biochimie Appliquée (T)
DILLEMANN G.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
DEYSSON G.	Botanique (T)
MICHEL R.	Endocrinologie (T)
FLAHAUT J.	Minéralogie (T)
RENAULT J.	Chimie Organique (T)
LE HIR A.	Pharmacie Galénique (T)
BOUDENE C.	Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)
DELAVEAU P.	Matière Médicale et Séméiologie
LARUELLE P.	Physique

P R O F E S S E U R S (suite)

ROSSIGNOL, P.	Pharmacodynamie
MANGEOT A.	Pharmacie Galénique Industrielle
COHEN Y.	Pharmacodynamie
RENAULT H.	Physique
BOURDON R	Chimie Analytique
REYNAUD P.	Pharmacie Chimique
LE MOAN R.	Toxicologie
POISSON J.	Pharmacie Galénique
LECLERC M.	Hématologie

M A I T R E S _ D E _ C O N F E R E N C E S

PAOLETTI C.	Toxicologie
DESVIGNES A.	Cryptogamie et Techr que Bactériologique
PERCHERON F.	Chimie Biologique
SAVEL J.	Biologie Animale
BORY M.	Microbiologie
MIOCQUE M.	Chimie organique
GUIGNARD J.L.	Botanique Générale
GOUNELLE J.C.	Physiologie
BINET P.	Biologie Animale
COMBET-FARNOUX C.	Chimie Organique
PLAT (Mme M.)	Législation et Déontologie Pharmaceutique
DELACOUX E.	Pharmacie Chimique
ADOLPHE C.	Physique
GUERNET M.	Chimie analytique et Bromatologie
DIDRY J.	Mathématiques
KHODADAD P.	Chimie Minérale et Minéralogie

M A I T R E S _ D E _ C O N F E R E N C E S (suite)

PERLES R. (F.F.)..... Chimie Biologique

YONGER J. (F.F.)..... Chimie Analytique

RIVET J. (F.F.)..... Chimie Générale et Minérale

HAZEBROUCQ (F.F.)..... Physique

ETIENNE J. (F.F.)..... Mathématiques

MESTRE J. (F.F.)..... Botanique

BOURRINET P. (F.F.)..... Hygiène Education Sanitaire

SOULEAU Ch. (F.F.)..... Chimie Générale et Minérale

C H E F S _ D E _ T R A V A U X _ P R A T I Q U E S

AGNERAY J..... Chimie Biologique

ASTIN C. (F.F.)..... Physique

BLANC (Mme J.)..... Chimie Organique

BARNIER (Mme S.)..... Mathématiques

BESANCON (F.F.)..... Mathématiques

BOURNIQUE (Mle C.) (F.F.)..... Physiologie végétale

BERNARD (Mle J.)..... T.P. Microbiologie 4ème année

BIGET (Mme M.-P.)..... Mathématiques

CARLIER A..... C.E.S. Pharmacie Galénique Industrielle

CENAC (Mme J. (F.F.)..... C E S. Parasitologie Pharmaceutique et Technique

CHARPENTIER (Mme J. (F.F.)..... Chimie Préparation

CHOIX (Mle M.)..... Pharmacie Galénique

CLAIR (Mle G) (F.F.)..... Essais des Médicaments Végétaux

DAGRON C..... Chimie Organique

DELCOURT A..... Botanique

COMPAGNON P. (F.F.)..... Chimie Organique

C H E F S _ D E _ T R A V A U X _ P R A T I Q U E S (suite)

DAVY J. (Mme (F.F.)	C.E.S. Biochimie
DECAUDIN (Mle M.-T.)	Parasitologie
DREUX C.	C.E.S. Electrochimie Appliquée à l'Analyse
DUMANT (Mle G.)	C.E.S. Contrôle des Médicaments (Physico-Chimie)
DUPONT (Mme C.)	Pharmacodynamie
ETIENNE G.	Pharmacie Galénique
FLEURY (Mle S.)	E.D. Chimie Analytique
FOGLIETTI (Mle M.-J.)	Chimie Biologique
GOURSAT (Mle M.J.)(F.F.)	Botanique
GAYRAL P. (F.F.)	T.P Zoologie
HAMON M.	Chimie Analytique
HARISPE J. +,	Chimie Organique
HENRY J.	Chimie
HUBERT (Mme J.)	C.E.S. Bactériologie Pharmaceutique et Technique
JUND (Mle Y.)	C.E.S. Immunologie Générale et Appliquée
JULIEN R. (F.F.)	Chimie Minérale Ière Année
LAROCHE J.	Physique
LEBOEUF M. (F.F.)	C.E.S. Pharmacotechnie Chimique et Galénique
LEGER (Mme N.)	Parasitologie
LALEGERIE P. (F.F.)	C.E.S. Biochimie
LE DUC (Mme Y.)	T.P. Chimie 4ème Année
LELUC R.	Microbiologie
LEMONNIER A.	Chimie Analytique
LEVILLAIN P.	Chimie Analytique
LIKFORMAN J.	Physique
LONGEVIALE (Mle M.)	Botanique

C H E F S _ D E _ T R A V A U X _ P R A T I Q U E S (suite)

MACCARIO J. (F.F.)	Mathématiques
MANDEREAU J.	C.E.S. Pharmacotechnie Chimique et Galénique
MAHUZIER J. (F.F.)	Chimie Analytique
MARTIN-FRERE H.	Chimie Générale Ière Année
MICHELET A. (F.F.)	Chimie Minérale
MORIN (Mle H.)	C.E.S Pharmacodynamie et essais biologiques des Médicaments
MOULIN P. (F.F.)	Physique
NOTTEGHEM (Mme M.) (F.F.)	Zoologie
NGUYEN PHU LICH (F.F.)	C.E.S. Toxicologie et Etudes Sanitaires
PARIS M.	C.E.S. Analyse Appliquée au Contrôle des Médicaments (Biologie)
PESTIS J.	Biologie Animale
POULLAIN P.	C.E.S. Hématologie
PRAT (Mme M.T.)	Mathématiques½
RODIER N. (F.F.)	Physique
ROLLEN (Mle A.)	Botanique
ROUSSELET (Mle R.)	Essais des Drogues Végétales
ROBERT (Mme M.)	C.E.S. Immunologie Générale et Appliquée
ROUSSELET F.	Biochimie Appliquée
SEILLER (Mme M.)(F.F.)	Pharmacie Galénique Industrielle
STRUPLER (Mle N.)	Chimie Générale et Minérale
TRUONG CONG TRIEU	Chimie Analytique
TROUPEL (Mme S.) (F.F.)	Chimie
VIERFOND J.M. (F.F.)	E.D. Chimie Organique
VILLERS J. (F.F.)	Physique

B I B L I O T H E Q U E

RUYSSEN (Mle Y.)..... Conservateur en Chef +,
LAVAUD (Mle S.)..... Conservateur +,
DESGRIPPES (Mme A.)..... Conservateur
BOUVRESSE (Mle A.M.)..... Bibliothécaire

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

+ Légion d'Honneur
O Officier
C Commandeur

RECHERCHES SUR L'AMINE-OXYDASE ET SUR SON ROLE DANS LA MANIFESTATION DE CERTAINES POTENTIALITES TOXIQUES.

LISTE DES ABREVIATIONS
EMPLOYEES DANS LE TEXTE.

A	fractions obtenues par centrifugation en gradient
B	de densité et dont la composition est définie page 34
COMT	catéchol O méthyl transférase.
DOC Na	désoxycholate de sodium.
E	enzyme.
ES	complexe enzyme-substrat.
g	accélération de la pesanteur ou constante de gravité : 9,81 $cm.sec^{-2}$.
g.min.	unité proposée par de Duve et Berthet (Nature, 1953, 172, 1142) et exprimant l'intégrale de temps du champ centrifuge moyen.
gr	gramme. Afin d'éviter une confusion possible avec le symbole de la constante de gravité, nous adoptons l'abréviation gr au lieu de g pour désigner le mot gramme
IMAO	inhibiteur de la monoamine-oxydase.
Km	constante de MICHAELIS.
Ks	constante d'équilibre du complexe enzyme-substrat ou constante d'équilibre de la réaction de dissociation de ES en E + S.
MAO	monoamine-oxydase.
Mb	fraction mitochondriale brute dont la composition est définie page 33
Mp	fraction mitochondriale purifiée dont la préparation est décrite page 33.
P	produit de la réaction enzymatique.
r	constante d'inhibition relative.
rpm	révolutions par minute
S	substrat
V	vitesse initiale de la réaction de désamination.
Vmax	vitesse initiale maximum de la réaction de désamination.
W	poids de tissu homogénéisé.

Le terme "Désamination oxydative" appliqué aux amines biologiques désigne le processus enzymatique qui transforme leur fonction amine primaire, secondaire ou tertiaire en fonction aldéhyde. Les enzymes catalysant ces réactions sont appelés Amine-oxydases d'une façon générale, ce qui n'exclut pas les termes particuliers tels que : Monoamine-oxydase, Benzylamine-oxydase, Histaminase, Spermine-oxydase. L'enzyme qui fait l'objet de cette thèse se rattache au groupe des Monoamine-oxydases, E.C. 1.4.3.4. La Commission des enzymes a classé les Amine-oxydases dans la famille des oxydo-réductases agissant sur le groupement -CH-NH_2 des donneurs (groupe 1.4) avec l'oxygène comme accepteur (groupe 1.4.3). La Commission distingue la Monoamine : O_2 oxidoreductase (deaminating), 1.4.3.4. et la Diamine : O_2 oxidoreductase (deaminating), 1 4.3.6. Le terme "Désamination oxydative" employé sans autre spécification dans le texte désigne la désamination des amines. Un processus enzymatique analogue existe en effet pour les aminoacides et les acides nucléiques.

CHAPITRE I

Dans une revue générale publiée en 1952, BLASCHKO relate les premiers travaux qui furent consacrés dès la fin du dix-neuvième siècle à la désamination oxydative. Des expériences in vivo (SCHMIEDEBERG, 1877, 1881, MINKOVSKI, 1883, MOSSO, 1889, GUGGENHEIM et LOFFLER, 1916,) ou la perfusion d'organes isolés (EWINS et LAIDLAW, 1910, 1913, GUGGENHEIM et LOFFLER, 1916) permettaient de conclure que le catabolisme des amines aromatiques ou aliphatiques comporte une désamination et une oxydation qui aboutissent à un aldéhyde. Celui-ci est habituellement transformé en acide par l'aldéhyde déshydrogénase. Par exemple, si on administre de la phényléthylamine, per os, à un lapin, on recueille dans l'urine de l'acide phénylacétique (GUGGENHEIM et LOFFLER 1916). De même, en incubant de la tryptamine en présence de différents tissus humains, on obtient de l'acide indolacétique (LEVINE et SJOERDSMA, 1962 et tableau I) MINKOWSKI (1883) fut le premier à reproduire cette réaction in vitro ouvrant ainsi la voie à l'identification des enzymes désaminants. En 1928, Mary L.C. HARE démontre l'oxydation enzymatique de la tyramine par différents tissus de mammifères (HARE, 1928) Au cours des années suivantes, d'autres expérimentateurs constatèrent que l'histamine (BEST, 1929), l'adrénaline (BLASHKO et coll., 1937), les amines aliphatiques (PUGH et QUASTEL 1937 a et b) pouvaient être catabolisées également par la voie de la désamination oxydative Actuellement, ces réactions de désamination ont été mises en évidence chez tous les êtres vivants, animaux, végétaux, microorganismes. Chez un individu donné, on a pu en observer dans presque tous les tissus (BLASCHKO, 1952, 1963, ZELLER, 1963 a et b) ainsi que les tableaux I et II).

TABLEAU I

TISSUS	VITESSE de désamination	Rapport des vitesses La vitesse la plus élevée = 100
Muqueuse jéjunale	673,3	100
Foie	416,6	61,8
Rein	250	37,1
Coeur	166,6	24,7
Poumon	135	20
Thyroïde	106,6	15,8
Médullo-surrénale	105	15,5
Pancréas	81,6	12,1
Ganglion sympathique	73,3	10,8
Cortex cérébral	66,6	9,8
Hypophyse	26,6	3,9
Rate	16,6	2,4
Muscle squelettique	11,5	1,7
Testicule	8,1	1,2

Désamination oxydative de la tryptamine dans différents tissus chez l'homme, d'après LEVINE et SJOERDSMA, 1962. Les vitesses de désamination sont exprimées en millimicromoles d'acide indolacétique formé par minute par gramme de tissus.

TABLEAU II

Tissus		Nombre d'essais	Activité spécifique
Homme	foie	3	3,70 ± 0,44
	rein	3	2,45 ± 0,50
	cerveau	9	0,33 ± 0,04
Cobaye	foie	13	10,23 ± 1,79
	intestin grêle	3	3,20 ± 0,13
	rein	4	2,94 ± 0,18
	coeur	3	1,73 ± 0,14
	cerveau	6	0,96 ± 0,13
	poumon	3	0,57 ± 0,09
	muscle	3	0,09 ± 0,04
Rat Wistar			
	foie	11	2,33 ± 0,36
	coeur	3	1,87 ± 0,19
	intestin grêle	3	0,47 ± 0,14
	cerveau	6	0,43 ± 0,06
	poumor	3	0,35 ± 0,11
	muscle	4	0,08 ± 0,03

Désamination oxydative de la cynuramine dans différents tissus de mammifères. Les activités spécifiques sont exprimées en millimicromôles de 4 hydroxyquinoléine produites par minute et par milligramme de protéine (voir page 24). Pour toutes les valeurs nous indiquons l'écart type sur la moyenne.

On connaît plusieurs enzymes capables de catalyser les réactions de désamination, enzymes dont certains ont pu être purifiés.

Citons par exemple, l'amine-oxydase des graines de pois qui a été purifiée 1300 fois par WERLE et ses collaborateurs (1961), la diamine-oxydase du rein de porc purifiée 2000 fois (KAPPELER-ADLER et MAC FARLANE, 1963), la benzylamine-oxydase du plasma de porc (BUFFONI et BLASCHKO, 1965), la monoamine-oxydase du plasma humain purifiée 5000 fois par MAC EWEN (1965a). Ces enzymes sont impliqués dans des mécanismes aussi essentiels que le catabolisme des catécholamines, de la sérotonine, de l'histamine, des amines aliphatiques telles que la spermine et la spermidine. On les distingue les uns des autres par des différences de spécifité, de localisation intracellulaire ou d'inhibition. Malgré la diversité de leurs origines, ils catalysent tous le même type de réaction qui peut s'écrire :

$$\text{AMINE} + O_2 + H_2O \longrightarrow \text{ALDEHYDE} + NH_3 + H_2O_2 \qquad (I.1)$$

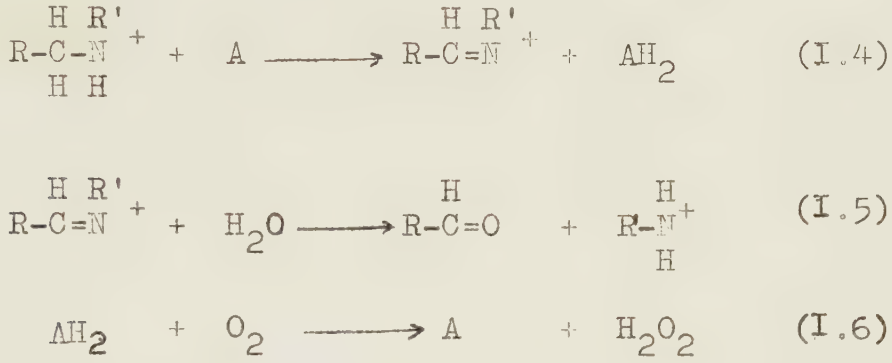
Par analogie avec ce qui se passe dans le cas de l'aminoacide-oxydase on a proposé un mécanisme de réaction avec formation puis hydrolyse d'un imino-dérivé (PUGH et QUASTEL, 1937 a, RICHTER, 1937) :

$$\begin{matrix} H & R' \\ | & | \\ R-C-N^+ \\ | & | \\ H & H \end{matrix} + O_2 \longrightarrow \begin{matrix} H & R' \\ | & | \\ R-C=N^+ \end{matrix} + H_2O_2 \qquad (I.2)$$

$$\begin{matrix} H & R' \\ | & | \\ R-C=N^+ \end{matrix} + H_2O \longrightarrow \begin{matrix} H \\ | \\ R-C=O \end{matrix} + \begin{matrix} H \\ | \\ R'-N^+ \\ | \\ H \end{matrix} \qquad (I.3)$$

BLASCHKO (1952) a suggéré que dans la cellule in vivo, l'enzyme réagit en présence d'un accepteur d'hydrogène qui ne

serait pas l'oxygène. La nature de cet accepteur n'est pas connue. La réaction serait alors :



(I.4)

(I.5)

(I.6)

R = radical alkyl ou arylakyl
R'= H ou CH_3
A = accepteur d'hydrogène

La première mention d'un enzyme désaminant au niveau du système nerveux central est dûe à PUGH et QUASTEL (1937 a et b). Ces auteurs montrèrent que le cerveau de divers mammifères contient un enzyme capable de catalyser la désamination des amines supérieures : butylamine, amylamine, isoamylamine et heptylamine, de la tyramine et de l'indoléthyl amine. Depuis, de nombreux auteurs ont étudié l'enzyme ou plus simplement déterminé son taux dans le cerveau de plusieurs espèces : rat (PUGH et QUASTEL, 1937 b, WEINER, 1960 b, GREEN et ERICKSON, 1962, ZOLOVICK et coll., 1966), chien (WEINER, 1960 a et b), cobaye (BLASCHKO et coll., 1937 a, PUGH et QUASTEL, 1937 b, WEINER, 1960 b), carpe (BURKARD et coll. 1963), porc (BLASCHKO et coll., 1937 a), souris (HOPE et SMITH, 1960, WEINER, 1960, ELEFTHERIOU et BOEHLKE, 1967), boeuf (NAGATSU, 1966), chat (WEINER, 1960), lapin (WEINER, 1960, KALIMAN, 1965), mouton (PUGH et QUASTEL, 1937 b). De très intéressantes études histochimiques ont également été publiées (GLENNER et coll., 1951,

SHIMIZU et coll., 1959, SMITH, 1963, TEWARI et BOURNE, 1965, O'STEEN et CALLAS, 1964, O'STEEN et DILL, 1964). Chez l'homme, les taux d'enzymes au niveau du système nerveux central ont fait l'objet de quelques travaux (BIRKHAUSER 1941, UDENFRIEND et coll., 1957, WEINER, 1960 a et b, LEVINE et SJOERDSMA, 1962).

BIRKHAUSER (1941) a étudié la répartition de l'enzyme dans les différentes régions du cerveau humain et trouvé que le globus pallidus et le thalamus sont les zones les plus riches. Viennent ensuite le noyau caudé et le putamen, puis le cortex qui est deux fois moins actif que le thalamus.

WEINER (1960 b) a étudié l'amine-oxydase des mitochondries préparées à partir de différentes parties du cerveau. Il a déterminé la spécifité de l'enzyme en le testant à l'aide de dix substrats : tyramine, sérotonine, tryptamine, dopamine, l nor-adrénaline, l adrénaline, dl phényléthanolamine, n amylamine, isoamylamine, phényléthylamine. Les résultats sont pratiquement semblables d'une région à l'autre, ce qui tendrait à prouver que le cerveau ne contient qu'un seul type d'amine-oxydase. Cependant, WEINER note que le thalamus, l'hypothalamus, le putamen et le globus pallidus ont les activités spécifiques les plus élevées tandis que le cerebellum a l'activité la plus basse.

LEVINE et SJOERDSMA (1962) ont mesuré la vitesse de désamination de la tryptamine dans des homogénats de cortex cérébral et d'hypophyse (tableau I).

Le rôle de l'amine-oxydase au niveau du système nerveux central est connu. Cet enzyme catabolise la nor-adrénaline, la dopamine et la sérotonine. La nor-adrénaline est libérée à partir des terminaisons nerveuses et joue le rôle de médiateur chimique vis-à-vis de différents tissus et organes :

muscles lisses, foie, endomètre, parois vasculaires, coeur, tissus adipeux, ainsi que de neurone à neurone au sein du tissus cérébral. Elle est synthétisée et stockée par les tissus nerveux et sympathique ainsi que par la médullo-surrénale, au niveau de granules dits "granules chromaffines". Dans ces particules subcellulaires spécialisées, se fait la transformation de la dopamine en nor-adrénaline catalysée par la dopamine β hydroxylase. La forme de stockage serait une association nor-adrénaline -ATP-Mg^{++}- Protéine spécifique. Il semble cependant que normalement la synthèse de nor-adrénaline soit continue et dépasse les capacités de réserve. A côté du "pool granulaire" existerait un "pool cytoplasmique" de catécholamines libres en particulier de nor-adrénaline et de sérotonine (BRODIE et BEAVEN, 1963). Le rôle de l'amine-oxydase serait d'inactiver cet excédent d'amine pour l'empêcher d'exercer sur les organes cibles des actions non spécifiques.

Cependant, si la fonction de l'enzyme dans les tissus riches en catécholamines (tissus nerveux, sympathique, médullo surrénale) semble établi, il n'en va pas de même pour ceux dont la teneur en amines est faible et qui ont cependant une forte activité désaminante. Les tableau I et II montrent que chez trois mammifères, presque tous les tissus, en particulier le foie, le rein et l'intestin grêle sont beaucoup plus riches en amine-oxydase que le cerveau, les ganglions sympathiques ou la médullo surrénale.

Au niveau de l'intestin grêle, l'enzyme intervient dans la désamination oxydative d'un certain nombre d'amines qui sont réabsorbées au cours de la digestion (BLASCHKO, 1962,

BLACKWELL 1963, BLACKWELL et coll., 1964, BLACKWELL et MABBIT, 1965). Ces amines proviennent de certains aliments, qui tels les fromages fermentés (BLACKWELL et MABBIT, 1965) sont très riches en tyramine (1) ou de la décarboxylation des acides aminés par des bactéries intestinales (MELLANBY et TWORT,1912, MELNYKOWYCZ et JOHANSSON, 1955).

On a constaté que l'emploi en thérapeutique de certains médicaments antituberculeux ayant par ailleurs un effet inhibiteur sur l'amine oxydase, s'accompagnait parfois de crises hypertensives (OGILVIE, 1955).

En 1963, BLACKWELL put expliquer l'étiologie de ces intoxications : l'inhibitionde l'amine-oxydase intestinale était responsable de la réabsorption massive d'amines hypertensives, dont la tyramine, provenant surtout de la consommation de certaines variétés de fromages. Ces faits, sont venus corroborer l'hypothèse de BLASCHKO qui voyait dans l'amine-oxydase intestinale et hépatique : un "detoxicating agent". (BLASCHKO, 1962). Un enzyme voisin, l'histaminase, capable de désaminer activement l'histamine au niveau du foie et surtout de l'intestin grêle (COTZIAS et DOLE, 1952, BURKARD, 1954, VALETTE et coll., 1956)protège l'organisme contre les effets bien connus de cette amine. Ce qui explique que l'histamine que l'on trouve en grande quantité dans le tractus digestif de certains animaux soit beaucoup plus toxique lorsqu'elle est injectée par voie parentérale que lorsqu'elle est ingérée (BOVET et BOVET-NITTI, 1948).

---

(1) BLACKWELL et MABBIT (1965) notent que le mot tyramine dérive du grec "tyros" qui signifie :fromage rappelant que cette amine provient de la tyrosine qui fut isolée à partir du fromage par LIEBIG en 1846.

Dans la cellule hépatique l'amine-oxydase est liée à la membrane externe des mitochondries (SCHNAITMAN et coll., 1967, AMAR-COSTESEC, résultats non publiés). D'autre part, on a décrit, au cours de l'intoxication par le tétrachlorure de carbone, des altérations morphologiques des mitochondries (REYNOLDS, 1963). Nous nous sommes demandés si les destructions cellulaires provoquées par le toxique pouvaient s'accompagner de la libération d'amine-oxydase dans le plasma (TRUHAUT et coll., 1964). Chez des rats intoxiqués par injection intrapéritonéale de tétrachlorure de carbone nous n'avons pas détecté d'enzyme plasmatique par la méthode de WEISSBACH et coll., (1960). Le plasma ne renfermait pas, non plus, un enzyme cytoplasmique, la catéchol O méthyl transférase que nous avions également recherché à titre de comparaison par une méthode très sensible utilisant l'adrénaline tritiée.

Cependant, nos recherches sur l'amine-oxydase tendent vers un autre but : apporter des arguments à l'hypothèse selon laquelle l'enzyme joue au niveau du foie et probablement aussi, du rein, un rôle dans le catabolisme et la destruction d'amines endogènes ou exogènes susceptibles d'exercer un effet toxique sur certains métabolismes cellulaires. On peut difficilement attribuer à l'enzume du foie ou du rein, un rôle analogue à celui de l'amine-oxydase cérébrale, car ces deux organes ne contiennent que de très faibles quantités de catécholamines et de sérotonine. Leur richesse en terminaisons nerveuses -synaptosomes- est également modeste. Dans ces conditions, quel est le rôle de l'amine-oxydase au niveau du foie et du rein? Nous ne prétendons pas, dans cette thèse, apporter une réponse à cette question. Nous voudrions, plus modestement définir les données du problème et tenter

d'apporter les premiers éléments de sa solution. Il nous semble que la démarche qui s'impose d'emblée est une comparaison de l'enzyme au niveau des trois organes mentionnés.
S'agit-il du même enzyme? S'agit-il chaque fois d'un enzyme différent? Auquel cas on concevrait sans peine que son rôle soit également différent.
Nous nous proposons de rapporter en détail la purification partielle de l'enzyme cérébral. La purification de l'amine-oxydase à partir des deux autres sources ne posait pas de problèmes majeurs. Nous avons pu nous inspirer de travaux analogues relatifs à l'amine-oxydase d'autres mammifères que l'homme. (BARSKY et coll., 1953, COTZIAS et coll., 1954, GORKIN, 1963, COQ et BARON, 1964, GUHA et KRISNA MURTI, 1965, AMAR-COSTESEC et BOHUON, 1965, YOUDIM et SOURKES, 1966, KLYASHTORIN et coll., 1966, GABAY et coll., 1966, AMAR-COSTESEC, 1966).

Mais en ce qui concerne la purification de l'amine-oxydase du tissus nerveux, il n'existait à l'époque ou fut entrepris ce travail (1964) aucune donnée dans la littérature. Depuis est paru le travail de NAGATSU (1966) concernant l'enzyme du cerveau de boeuf. Cependant notre procédé permet un enrichissement supérieur à celui obtenu par cet auteur.
Le choix de tissus humains dans notre étude se justifie par le fait que la spécificité de l'amine-oxydase varie d'une espèce à l'autre. Dans ces conditions, il nous a paru préférable, malgré les difficultés pratiques que cela comportait, de travailler sur des tissus humains. Il serait en effet d'un grand intérêt de savoir si au niveau de deux organes - le foie et le rein - l'amine-oxydase peut modifier certaines potentialités toxiques chez l'homme.

Le plan adopté dans cette thèse est le suivant:
Après ce chapitre d'introduction, le chapitre II expose les méthodes expérimentales suivies. Le chapitre III décrit la purification de l'enzyme. Le chapitre IV est consacré aux expériences de cinétique et à l'exposé de leurs résultats. Ceux-ci sont comparés aux données de la littérature et discutés dans le chapitre V.
Enfin dans la conclusion est souligné l'apport original de ce travail à la connaissance des amine-oxydases au niveau du système nerveux central, du foie et du rein.

CHAPITRE II

Dans ce chapitre sont exposées les méthodes utilisées. Nous décrivons le matériel biologique étudié (paragraphe 1), le dosage de l'enzyme (paragraphe 2), la détermination de l'azote et des protéines (paragraphe 3).

1. Matériel biologique.

Les tissus humains étudiés proviennent d'autopsies précoces (moins de 2 heures après le décès) ou d'interventions chirurgicales sur des sujets n'ayant pas reçu de médication susceptible de modifier l'activité de l'enzyme étudié (inhibiteurs de la monoamine-oxydase). Des examens histologiques ont été pratiqués sur les tissus étudiés par R. GERARD-MARCHANT. L'amine-oxydase se conserve de façon très satisfaisante dans les prélèvements biologiques stockés vers 0° C ou au-dessous (Tableau III).

2. Mesure de la vitesse de désamination.

Parmi les nombreuses méthodes de dosage de l'amine-oxydase (SOEP, 1962 et tableau IV) nous en avons choisi deux :

a) une méthode spectrophotométrique simple, bien adaptée aux études cinétiques puisque l'on suit l'évolution de la réaction en fonction du temps pour chaque détermination

b) une méthode colorimétrique sensible qui permet de travailler avec une gamme étendue de substrats puisque l'on dose l'ammoniac produit par la réaction de désamination (équation 1.1, page 9). Nous allons les détailler -

TABLEAU III

Tissus	Température de conservation °C	Vitesse de désamination après un temps de conservation de		
		3 h 15	4 h 30	22 h 45
Homogénat de foie de cobaye dans l'eau distillée. Activité spécifique: 3,24	+ 23	3,23	2,95	2,63
	+ 4	3,27	3,26	3,15
	- 20	3,12	3,34	3,30
	- 55	3,20	3,45	3,46
Mitochondries de foie de cobaye dans le saccharose 0,25 M. Activité spécifique: 8,00	+ 4	6,36	6,16	7,19
	- 20	8,11	7,83	7,55
	- 55	7,18	8,32	7,40
Mitochondries de cerveau humain dans le saccharose 0,25 M. Activité spécifique: 3,55	+ 4	3,18	3,23	2,05
	- 20	3,37	3,18	3,12

Désamination oxydative de la cynuramine. Variation de la vitesse de la réaction en fonction du temps de conservation à différentes températures. Les vitesses sont exprimées en millimicromôles de 4 hydroxyquinoléine formées par minute et par milligramme de protéine à 37° C et pH 7,4 (activité spécifique). Une préparation de mitochondries de cerveau humain dans le saccharose 0,25 M n'avait rien perdu de son activité après 13 mois de conservation à - 55° C.

TABLEAU IV

Auteurs	Substrat	Méthode de dosage	Sensibilité(1)	Principe de la méthode
SOEP(1962)	Tryptamine	Colorimétrie	au moins une dizaine de mg	Dosage, à la fin de la réaction enzymatique, de la quantité de substrat non attaquée. La tryptamine est extraite par le benzène et dosée par la para-diméthyl amino benzaldéhyde
BAUDHUIN et coll (1964)	Tyramine	Colorimétrie	ordre du mg	Dosage, par la méthode de RUSSELL (1944) de la quantité d'ammoniac produite au cours de la réaction de désamination
MAC EWEN (1965 b)	Octylamine	Colorimétrie	ordre du mg	Dosage de la quantité d'eau oxygénée formée En présence de péroxydase, l'eau oxygénée réagit avec l'o-dianisidine. Il se forme un produit coloré qui absorbe à 440 mμ.
CREASEY (1956)	Tyramine	Manométrie	une dizaine de mg	Dosage de la quantité d'oxygène consommée. Les autres oxydases pouvant interférer dans la détermination sont inhibées par la semicarbazide et le cyanure de potassium.

TABLEAU IV (suite)

Auteurs	Substrat	Méthode de dosage	Sensibilité(1)	Principe de dosage
TABOR, TABOR, ROSENTHAL (1954)	Benzylamine	Spectrophotométrie	ordre du mg	Dosage de la quantité de benzaldéhyde formée par mesure de son absorption à 250 mμ.
KRAML(1965)	Cynuramine	Fluorimétrie	ordre du milligramme	Dosage de la 4 hydroxyquinoléine formée par désamination de la cynuramine. Excitation à 315 mμ. Fluorescence maximun à 380 mμ.
WURTMAN et AXELROD(1963)	Tryptamine ^{14}C	Spectrophotométrie en scintillation liquide	5 μg	Extraction dans le toluène et dosage du produit formé par désamination, qui est, soit l'aldéhyde en absence d'aldéhyde déshydrogénase, soit l'acide 5 hydroxy indol acétique en présence de cet enzyme.
OTSUKA et KOBAYASHI (1964)	Tyramine ^{14}C	Spectrophotométrie en scintillation liquide	ordre du μg	Dosage de l'aldéhyde formé par désamination après extraction dans l'anisole.

(1) Quantité de foie de rat, sous forme d'homogénat dans le saccharose 0,25 M, nécessaire pour obtenir une réaction mesurable.

Méthodes de dosage de l'amine-oxydase. Chacun de ces exemples illustre une des possibilités de dosage : substrat ou oxygène consommés ou aldéhyde, ammoniac, eau oxygénée formée.

a) Méthode spectrophotométrique.

En 1955, MAKINO et coll. ont montré que des homogénats de foie de rat transforment la cynuramine (figure 1) en 4-hydroxy-quinoléine. La cynuramine se forme par décarboxylation d'un amino-acide, la cynurénine qui provient du catabolisme du trytophane chez le chien, le rat et le cobaye.

En 1959, WEISSBACH et coll. ont appliqué la réaction découverte par MAKINO au dosage spectrophotométrique de l'amine-oxydase. La cynuramine sous forme de bromhydrate est solube dans l'eau. Son spectre dans l'ultra violet a un maximum d'absorption à 358-360 mμ. La désamination in vitro de la cynuramine se fait selon le schéma de la figure 2.

La transformation enzymatique en aldéhyde est suivie d'une condensation non enzymatique en 4-hydroxy-quinoléine qui possède deux maxima : 316 et 329 mμ. L'attaque du substrat par l'amine-oxydase s'accompagne de la disparition progressive du pic à 360 mμ avec apparition simultanée des deux pics à 316 et 329 mμ (figure 3).

Il existe donc deux possibilités pour effectuer le dosage : suivre la disparition du substrat à 358-360 mμ ou suivre l'apparition du produit formé à 315 ou 325 mμ. Dans les études de cinétique, on préfère la deuxième éventualité. Dans nos conditions opératoires, la 4-Hydroxy-quinoléine a un coëfficient d'extinction de $1,2.10^{4}.M^{-1}.cm^{-1}$ à 316 mμ contre $3,7.10^{3}.M^{-1}.cm^{-1}$ pour la cynuramine à 360 mμ. A 316 mμ la sensibilité du dosage est augmentée d'un facteur 3. Nous avons employé les deux méthodes mais toutes les études de cinétique sont faites en suivant l'apparition du produit formé.

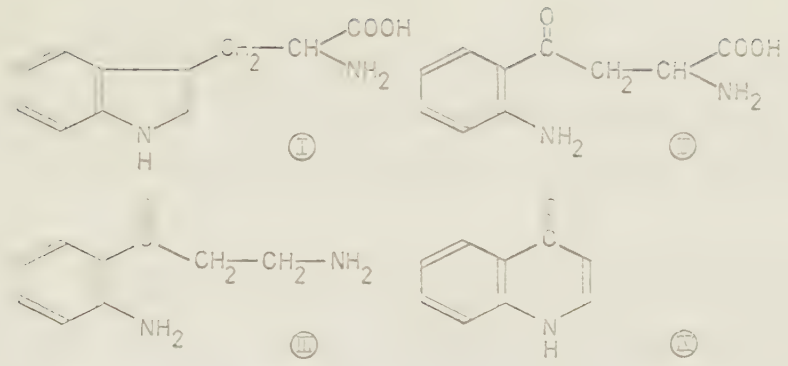


figure 1. I: tryptophane, II: cynurénine, III: cynuramine, IV: 4 hydroxy-quinoléine ou 4 (1H) quinolone.

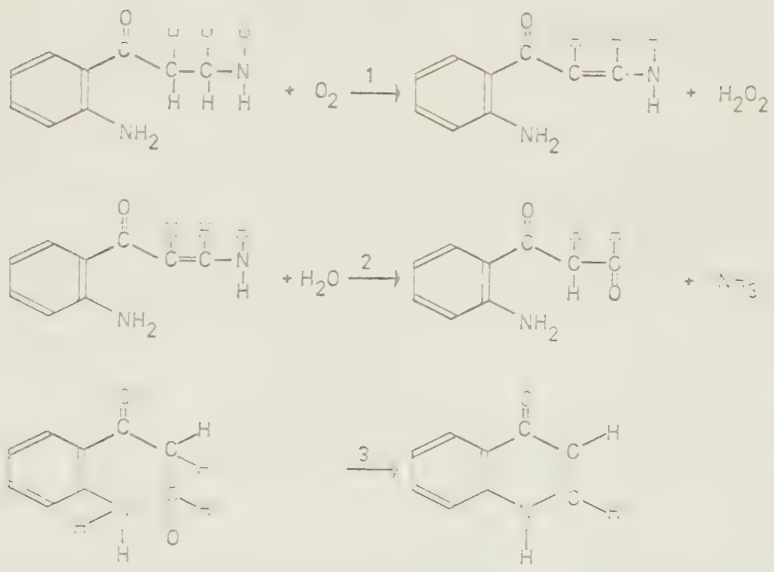


figure 2. Désamination oxydative de la cy-
-nuramine in vitro. Les réactions 1 et 2 sont catalysées par l'amine-oxydase. La ré-
-action 3 est une réaction de condensation non enzymatique.

Par souci d'homogénéité les résultats sont exprimés par rapport au produit de la réaction. Nous avons utilisé le spectrophotomètre Zeiss PM Q II avec le dispositif monochromateur M_4Q II.

Le dosage est effectué à 37° C $\pm$ 0,1° C, ce qui est contrôlé dans les cellules du spectrophotomètre à l'aide d'un thermocouple. Le porte-cellule est thermostaté par un courant d'eau et tous les réactifs, à l'exception de l'enzyme, sont pré-incubés à 37° C. Les déterminations sont faites en présence de tampon phosphate de potassium (50 mM). L'influence de la concentration du tampon sur la vitesse de la réaction n'est pas négligeable (figure 4).

En conséquence, nous avons effectué les corrections de volume nécessaires lorsque l'enzyme introduit dans le milieu réactionnel est en solution dans un tampon. Pour chaque dosage, on fait un témoin contenant tous les réactifs sauf l'enzyme.
La figure 5 montre la variation de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en enzyme, et la figure 6, en fonction du temps.

Lorsque la solution d'enzyme présente une turbidité importante, comme dans le cas des homogénats tissulaires, par exemple, la détermination est faite en présence de DOC Na à la concentration de 6 p. mille (voir page 36 et figure 9).

Par définition, l'unité d'amine-oxydase est la quantité d'enzyme qui, à pH 7,4 à 37° C et en présence de tampon phosphate (50 mM), produit 1 millimicromôle de 4 hydroxy-quinoléine par minute. L'activité spécifique est obtenue en ramenant le nombre d'unités au milligramme de protéine.

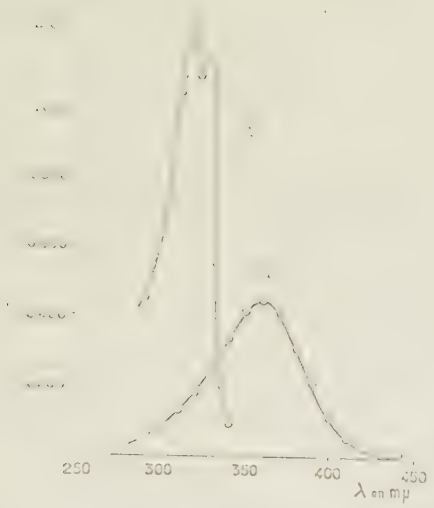


figure 3. 1: spectre d'absorp-
-tion de la 4 hydroxy-quinoléine
10^{-4}M dans le tampon phosphate
de potassium 50 mM. 2: spectre
du bromhydrate de cynuramine,
mêmes conditions. Spectrophoto-
-mètre Zeiss PMQ II, cuves de
[illegible]

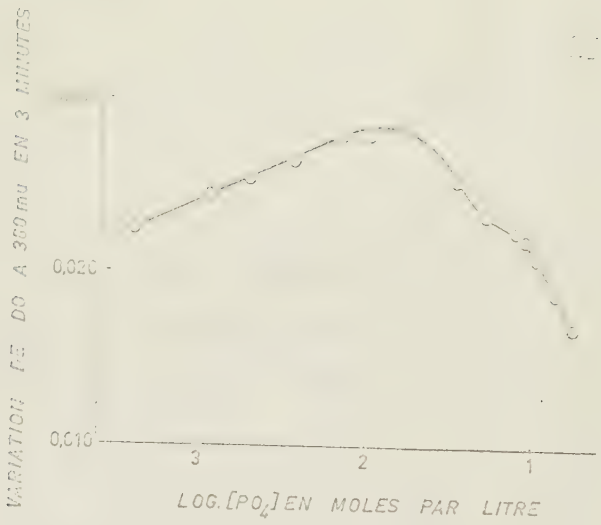


figure 4. Influence de la
concentration du tampon
phosphate sur la vitesse
initiale de désamination
de la cynuramine 10^{-4}M par
une préparation soluble d'
amine-oxydase. Il s'agit
d'une poudre acétonique de
mitochondries de foie de
cobaye. Des résultats com-
-parables sont obtenus avec
l'enzyme de cerveau humain.

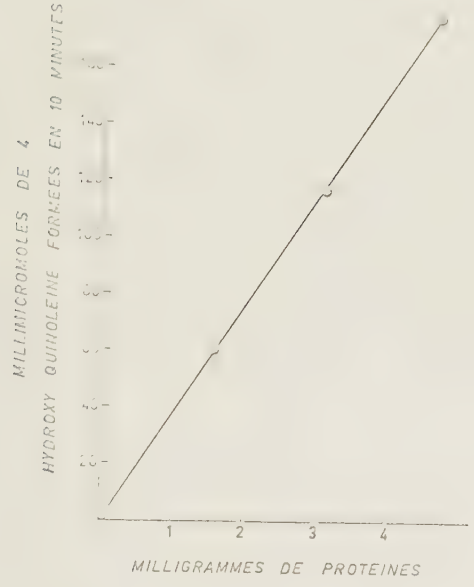


figure 5. Relation entre la
quantité de 4 hydroxy-quinolé-
-ine formée et la quantité d'
enzyme utilisée. Préparation
d'amine-oxydase de cerveau
humain enrichie 8 fois. Cynu-
-ramine 3,5.10^{-4}M.

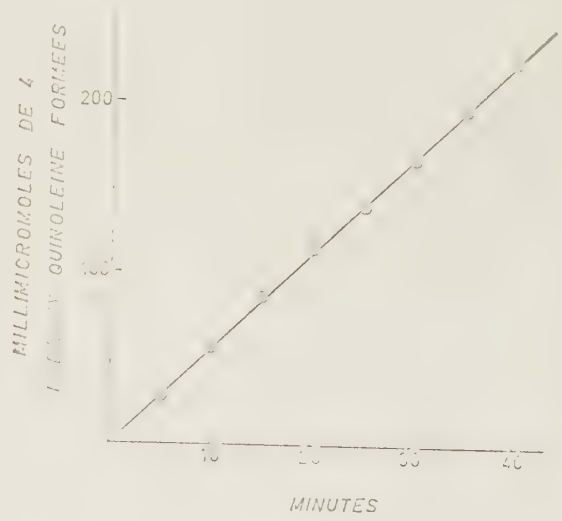


figure 6. Relation entre le
temps d'incubation à 37°C
et la quantité de 4 hydroxy-
quinoléine formée. Mêmes
conditions que figure 5. La
quantité d'enzyme corres-
-pond à 1,5 mg de protéines.

b) Méthode colorimétrique.

Cette méthode a été mise au point par BAUDHUIN et coll (1964) pour l'étude de la désamination oxydative de la tyramine dans les fractions obtenues, à partir du foie de rat, par centrifugation différentielle

L'enzyme est incubé à 37° C en présence de substrat (5mM) et de tampon phosphate de potassium pH 7,4 (50 mM) dans des flacons de verre (type flacon de pénicilline) fermés par un bouchon de caoutchouc. Le volume final est de 1 ml. Après 60 minutes d'incubation, la réaction est arrêtée par addition de 1 ml de carbonate de potassium saturé. L'ammoniac produit se trouve déplacé et on le recueille après diffusion sur l'extrémité rodée d'une petite baguette de verre, préalablement plongée dans de l'acide sulfurique normal

La baguette de verre perce un bouchon de caoutchouc dont on ferme le flacon de verre. La diffusion est accélérée en plaçant les flacons sur une roue qui tourne à 50 rpm selon la technique de SELIGSON et HIRAHARA (1957). Après 40 minutes, l'opération est terminée et l'ammoniac est recueilli en rinçant l extrémité rodée avec 1 ou 2 ml d'eau distillée. On dose par la réaction de BERTHELOT à l'hypochlorite - phénol alcalin selon la technique de RUSSELL (1944). La coloration bleue est lue au photomètre Zeiss à 640 mμ. Pour chaque échantillon on détermine la valeur d'un "blanc" contenant tous les réactifs y compris l'enzyme inactivé par addition de carbonate de potassium saturé. Comme pour les dosages, l'ammoniac des "blancs" est recueilli par diffusion. La relation entre la DO et la concentration en ammoniac s'exprime par une droite entre 0 et 10 μg La relation entre la DO et le temps d'incubation s'exprime par une droite entre 0 et 70 minutes La relation entre la DO et la quantité d'enzyme incubée s'exprime par une droite entre 0 et 4 mg de protéine

Par définition, l'unité d'amine-oxydase est la quantité d'enzyme qui, à pH 7,4, à 37° C et en présence de tampon phosphate (50 mM), produit 1 millimicromôle d'ammoniac par minute

c) Correspondance entre les deux unités définies.

On admettra que si l'on prend le même substrat (cynuramine), la même quantité d'enzyme correspondra à 1 unité dans les deux méthodes, bien que les conditions opératoires ne soient pas identiques notamment en ce qui concerne les concentrations en substrat et le temps d'incubation.

3. Dosage de l'azote total et des protéines

Les dosages d'azote ont été effectués par microkjeldahl dans le service de Chimie des Protéines de l'Institut de Recherches sur le Cancer, grâce à l'obligeance du Docteur R. VENDRELY
Les protéines sont dosées par la méthode de LOWRY et coll. (1951). Les courbes d'étalonnage sont faites à partir d'albumine bovine.

CHAPITRE III

Ce chapitre est principalement consacré à l'exposé de la méthode que nous avons suivie pour purifier l'amine-oxydase de cerveau humain. Nous décrivons la localisation intra-cellulaire de l'enzyme et la préparation de la fraction mitochondriale purifiée par séparation en gradient de densité (paragraphe 1), la solubilisation de l'enzyme (paragraphe 2), sa purification par chromatographie (paragraphe 3). Les paragraphes 4 et 5 traitent avec moins de détails de la purification de l'amine-oxydase de foie et de rein.

1. Localisation intracellulaire de l'amine-oxydase.

La localisation intracellulaire de l'amine-oxydase est très bien connue dans certains organes : dans la cellule hépatique, rénale, ou thyroidienne l'enzyme possède une localisation bimodale : dans les mitochondries et dans les microsomes (HAWKINS, 1952, de DUVE et coll., 1960, 1962, OSWALD et STRITTMATTER, 1963, BAUDHUIN et coll., 1964). Il n'en est pas de même dans tous les organes (de DUVE et coll., 1962). Dans le cerveau humain, WEINER (1960 b) ne trouve l'enzyme que dans les mitochondries. Avant toute tentative de purification, nous avons vérifié ce point.

Toutes les opérations se déroulent entre 0 et + 5° C. Les hémisphères cérébraux sont séparés, débarassés des méninges, lavés avec une solution de saccharose 0,25 M. Un fragment d'hémisphère, comprenant les substances blanche et grise, est pesé. Appelons ce poids W. Dans nos expériences W est compris entre 10 et 25 gr. Le tissu découpé en morceaux est lavé avec le saccharose et homogénéisé au Potter dans un volume de saccharose d'environ 3 x Wml.

L'homogénat est centrifugé à 3000 rpm pendant 5 min. dans le rotor SS 34 d'une centrifugeuse Serval SS 3, ce qui correspond à 5.400 g.min. au milieu du tube. On recueille le surnageant.

On ajoute au culot un volume de saccharose de 3 x Wml. On homogénéise au Potter et on centrifuge de nouveau à 5.400 g.min. On recueille le surnageant et on recommence l'opération une troisième fois. Les trois surnageants sont rassemblés et leur volume est porté à 10 W ml. Ceci constitue l'extrait cytoplasmique, tandis que le culot forme la fraction nucléaire. Les deux lavages de cette fraction permettent de récupérer le maximum de mitochondries dans l'extrait. Celui-ci est centrifugé dans le rotor 40 d'une centrifugeuse Spinco Beckman L 2 : 25 000 rpm pendant 11 min. soit : 450 000 g.min. Chaque tube contient 10 ml de E. Comme pour les noyaux, on lave 2 fois avec la solution de saccharose 0,25 M. La fraction obtenue est désignée sous le nom de fraction mitochondriale brute : M_b. Le surnageant contient, entre autres, les microsomes et la portion soluble de la cellule. On obtient finalement les fractions nucléaire, M_b, microsomiale et soluble, ainsi que l'extrait. Les protéines et l'amine-oxydase sont dosées dans chaque fraction. Les résultats sont exposés dans le tableau V, tandis que la figure 7 schématise les différentes étapes du fractionnement.

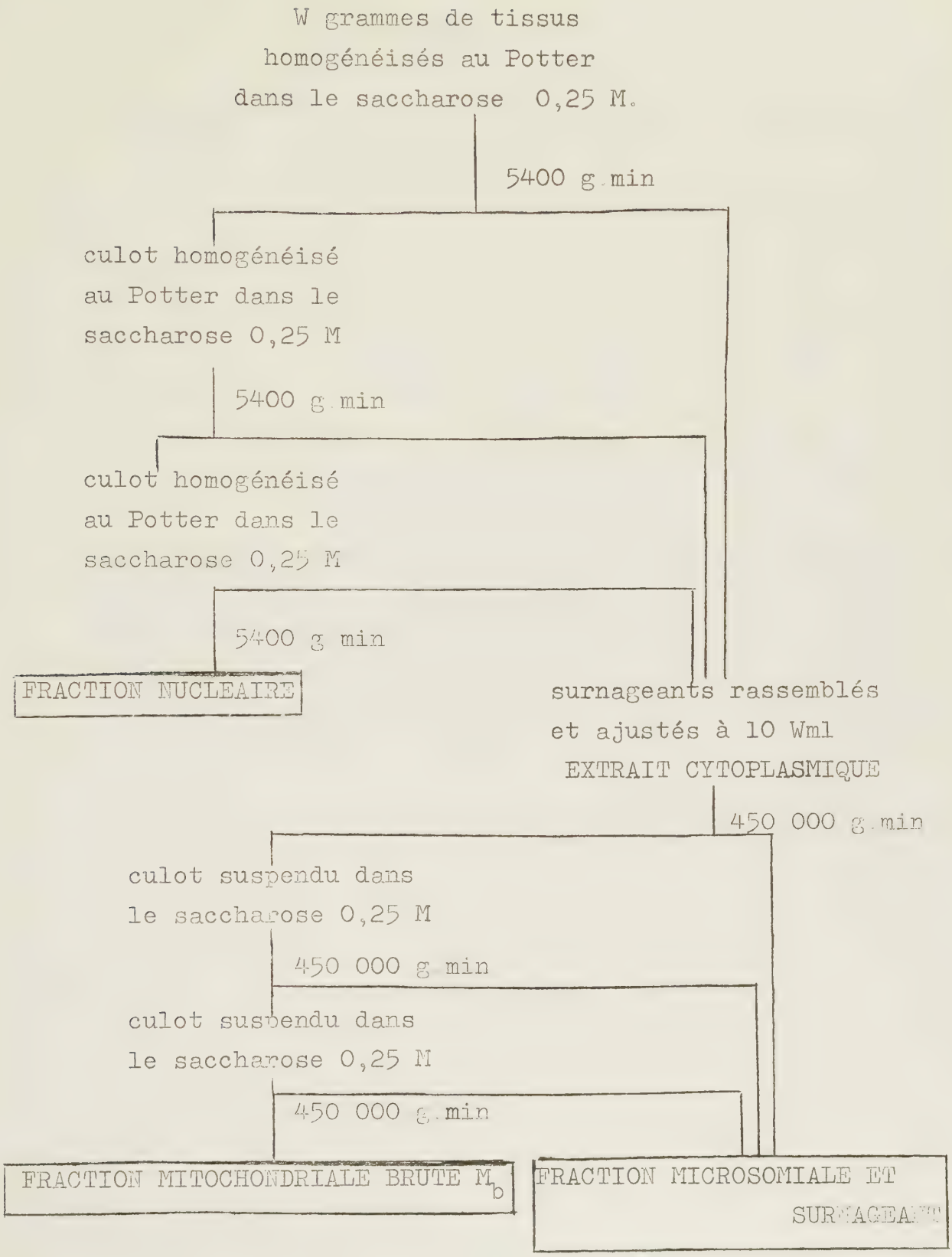


figure 7. Schéma de fractionnement du tissu nerveux

TABLEAU V

Fractions	Champ centrifuge en g.min	Protéines mg	Amine-oxydase Unités	Amine-oxydase %
Homogénat		5.777	2.368	100
Fraction nucléaire	10.500	3.438	1.003	45,8
Fraction mitochondriale M_b	450.000	981	1.118	51,1
Fraction microsomiale et surnageant		1.316	65	3,1

Séparation par centrifugation différentielle d'un homogénat de cerveau humain. Répartition de l'amine-oxydase et des protéines entre les différentes fractions. Pour obtenir la quantité de protéines et d'amine-oxydase dans l'homogénat on additionne les valeurs trouvées pour l'extrait cytoplasmique et pour les noyaux. La récupération à la fin du fractionnement est de 98,2 % pour les protéines et de 92,3 % pour l'enzyme Détails page 29 et 30

La fraction M_b obtenue précédemment contient, outre des mitochondries, des fragments de myéline, des synaptosomes, des vésicules synaptiques (WHITTAKER, 1959). On la soumet à un gradient de densité discontinu selon la technique de HEBB et WHITTAKER (1958 et figure 8).

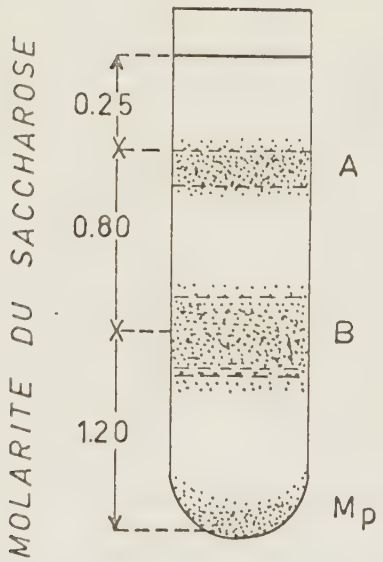


figure 8. Séparation de la fraction mitochondriale purifiée M_p sur un gradient discontinu de densité. 9 ml de M_b dans le saccharose 0,25 M sont déposés à la surface du gradient composé de 25 ml de saccharose 0,8 M et 25 ml de saccharose 1,2 M. Quantité de protéines par tube de 90 à 300 mg. Centrifugeuse Spinco Beckman modèle L_2, rotor SW 25.2, 25 000 rpm pendant 90 min. ($6,8.10^6$ g.min.). Autres détails page 34.

On sépare ainsi la fraction mitochondriale purifiée (M_p) qui sédimente au fond du tube. Au dessus, la couche B renferme les synaptosomes et les vésicules synaptiques. Les fragments de myéline restent en surface dans la couche A. Le tableau VI donne le résultat d'une préparation de mitochondries purifiées.

TABLEAU VI

	PROTEINES		AMINE-OXYDASE		
	mg	%	Unités	%	Activité spécifique
Fraction M_b	344,0		670,3		1,95
Couche A	142,4	40,8	58,7	9,0	0,41
Couche B	80,6	23,1	181,3	28,0	2,25
Culot M_p	126,4	36,1	409,9	63,0	3,24
Total	349,4		649,9		
Récupération	101,5 %		97 %		

Analyse de la fraction mitochondriale brute M_b sur un gradient discontinu de densité. Répartition de l'amine-oxydase et des protéines entre les différentes couches A, B et M_p (voir Fig. 8). L'activité enzymatique obtenue dans M_p correspond à un enrichissement de 6,5 fois par rapport à l'homogénat initial. Autres détails et abréviations page 33 et fig. 8

Ces expériences confirment les résultats de WEINER concernant la localisation uniquement mitochondriale de l'amine-oxydase du cerveau humain. On récupère finalement dans la fraction M_p 30 à 50 % de l'enzyme contenu dans l'homogénat tissulaire initial. Il faut cependant signaler que l'étude de la répartition des enzymes dans le tissu nerveux est difficile. Les premières centrifugations servant à préparer la fraction nucléaire, entraînent des proportions comprises entre 40 et 50 % de l'amine-oxydase. Il semble que près de la moitié des mitochondries sédimentent avec les noyaux. Malgré la répétition des homogénéisations, nous n'avons pu éliminer cet inconvénient. D'autres auteurs ont rencontré les mêmes difficultés avec les mitochondries de cerveau de boeuf. STAHL et coll., (1963) ne recueillent que 7 à 10 % d'un autre enzyme mitochondrial : une réductase de l'acide succinique.

2. Solubilisation de l'amine-oxydase mitochondriale.

Pour purifier l'amine-oxydase mitochondriale, un des problèmes les plus difficiles à résoudre est la libération de la protéine des structures auxquelles elle est liée.

La mitochondrie se compose d'une "matrice" entourée d'une membrane, dite membrane interne, comportant de nombreux replis - les crêtes - . Cette première membrane est enveloppée d'une seconde membrane ou membrane externe. Chacun de ces trois éléments possède un équipement enzymatique particulier. De minutieux essais de latence ont permis de localiser l'amine-oxydase sur la membrane externe avec une assez grande certitude. Ces essais partent du principe que si l'enzyme se trouve dans la matrice ou sur la membrane interne, on doit observer une vitesse de désamination plus élevée lorsqu'on fait éclater la membrane externe par un moyen physique ou chimique : congélation suivie de décongélation, détergents, ultrasons,.... Cette

augmentation de vitesse correspond au fait que le substrat ne doit plus franchir de membrane et accède plus facilement au site de l'enzyme. Ces expériences ont mené à la conclusion que l'amine-oxydase se trouve sur la membrane externe des mitochondries(1). D'autre part, on sait, depuis les premiers essais de purification, que l'amine-oxydase est très difficile à solubiliser et ce n'est que récemment, avec le perfectionnement des sonicateurs de laboratoire, que le problème a pu être résolu. La molécule d'enzyme est vraisemblablement incorporée dans l'assemblage lipido-protéique qui constitue les membranes mitochondriales et la destruction complète de ces dernières est nécessaire à sa libération.

La solubilisation de l'amine-oxydase des mitochondries de cerveau humain a été étudiée selon les principes que nous avions mis au point et adoptés dans un travail sur les mitochondries de foie de cobaye (AMAR-COSTESEC, 1966). Il est aujourd'hui clairement démontré que les meilleurs résultats sont obtenus en combinant les effets des sons et des ultra-sons à l'action d'un détergent. Celui-ci exerce un effet solubilisant sur la membrane lipo protéique, dont le mécanisme est mal connu mais dont les résultats sont reproductibles. Nous avons essayé quatre composés parmi les plus couramment employés : le Triton X 100, détergent non ionique, la digitonine, le cutscum ou iso octyl phenoxy poly éthoxy éthanol et le désoxycholate de sodium (DOC Na). Les meilleures solubilisations ont été obtenues avec ce dernier.

Cependant, un effet inhibiteur marqué du DOC Na a été observé à partir d'une certaine concentration (figure 9).

---

(1) D'autre part, l'étude en gradient de densité de mitochondries traitées par la méthode de PARSONS et coll., (1966) qui sépare la membrane externe, ainsi que les résultats de SCHNAITMAN et coll., (1967) ont entièrement confirmé ce point de vue

On peut également remarquer que l'effet légèrement activateur observé avec les mitochondries de foie de cobaye ne se retrouve pas avec celles provenant de cerveau humain. Celles-ci sont en outre beaucoup plus sensibles que les premières à l'effet inhi--biteur du DOC Na.

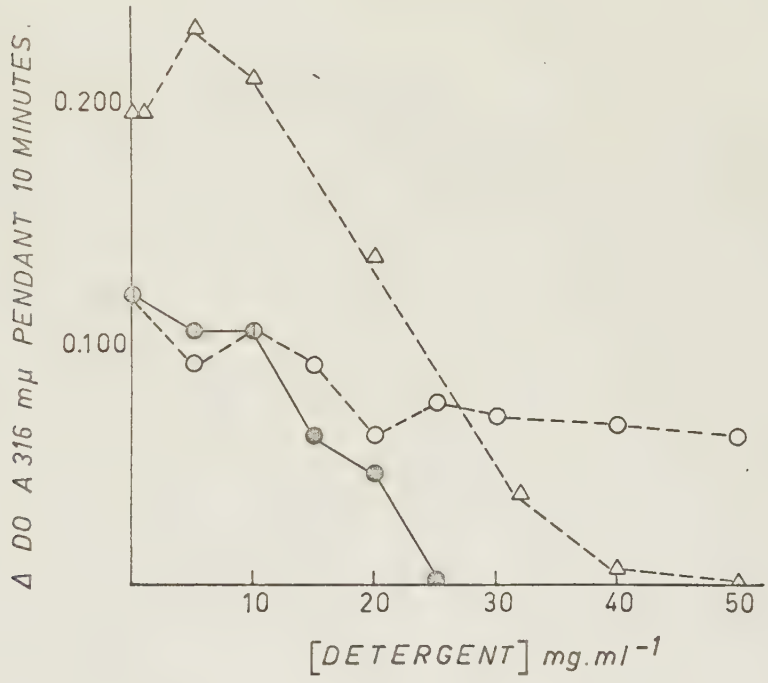


figure 9. Variation de l'activité amine-oxy--dase en fonction de la concentration du milieu d'incubation en détergent. Triangles: action du DOC Na sur l'enzyme des mitochon--dries de foie de cobaye. Cercles blancs: action du cutscum et cercles noirs: du DOC Na sur l'enzyme des mitochondries de cerveau humain.

En ce qui concerne le traitement par les ultra-sons, il semble avoir un double effet mécanique: dissociation des membranes et amélioration du contact entre le détergent et les lipoprotéines. Nous avons employé comme générateur d'ultra-sons l'appareil Siduse US 77 qui fournit une puissance utilisable de 200 Watts acoustiques par cm^2 Cet appareil possède deux sondes: l'une munie d'une ferrite vibrant à 23 kilocycles par seconde et l'autre capable de produire 1 Mégacycle par seconde à l'aide d'un quartz.

3. Purification de l'amine-oxydase.

La fraction mitochondriale M_P est mise en suspension dans du tampon phosphate de potassium 0,01 M à pH 7,6 additionné de DOC Na à la concentration de 6 p mille (P/V). On laisse en contact à la température du réfrigérateur pendant 15 minutes en agitant de temps à autre. La suspension est ensuite soumise, toujours vers 4° C, à un traitement ultra-sonique en deux temps: 4 minutes à 23 kilocycles par seconde, puis 20 secondes à 1 Mégacycle par seconde. La suspension est alors centrifugée pendant 25 minutes à 25.000 rpm dans le rotor 40 d'une centrifugeuse Spinco Beckman (10^6g.min). Le surnageant est soigneusement receuilli tandis que le culot subit un nouveau traitement par détergent et ultra-sons. Aprés trois traitements on recueille sous forme soluble environ 90% de l'amine-oxydase mitochondriale. Les surnageants sont rassemblés, placés dans un sac de dialyse et concentrés contre du saccharose en poudre. Après 45 minutes de contact la concentration est, en général, suffisante et la solution d'enzymes contenant 50 à 100 mg de protéines sous un volume de 3 à 4 ml est soumise à une chromatographie sur Séphadex G 200 équilibré avec du tampon phosphate 0,01 M pH 7,6. L'élution se fait avec le même tampon et on voit sur la figure 10 un profil de chromatographie typique. Ce traitemen a surtout pour effet d'éliminer les substrats internes qui pourraient interférer avec la réaction de dosage.

En effet, différents auteurs ont montré que lorsque l'amine-oxydase se trouve en présence de deux de ses substrats, la vitesse de désamination observée n'est pas la somme des deux vitesses obtenues avec chacun des deux substrats pris séparément, mais une vitesse, soit égale à la vitesse la plus élevée, soit intermédiaire entre les deux vitesses. (PUGH et QUASTEL, 1937 b, KOHN, 1937, BLASCHKO et coll., 1937 b, ALLES et HEEGARD, 1943, OSWALD et STRITTMATER, 1963). Au cours de l'homogénéisation du tissu nerveux, il y a libération d'amines qui, telles l'adrénaline, la dopamine, la sérotonine, la nor-adrénaline sont des substrats de l'amine-oxydase. L'intéraction, au niveau du site actif entre ces amines et la cynuramine a été étudiée par FULLER et WALTERS (1965) et par nous-même au cours d'une étude sur les taux d'amine-oxydase dans les tumeurs d'origine sympathique (AMAR-COSTESEC et coll , 1966). Nous donnons un exemple de ces phénomènes d'inhibition (figure 10).
Celle-ci, comme on pouvait s'y attendre, est du type compétitif. Il est donc intéressant d'obtenir des préparations enzymatiques débarassées d'amines pouvant interférer dans le dosage par la cynuramine. La préparation de la fraction mitochondriale suivie de la filtration sur Séphadex G 200 de l'amine-oxydase permet d'enrichir la préparation en enzyme et d'éliminer des substrats susceptibles de modifier les cinétiques qui font l'objet de ce travail. En pratique, les taux d'amines (adrénaline, nor-adrénaline, dopamine) n'ont jamais dépassé 0,01 ug.ml^{-1} dans nos parations. (figure 11).

figure 10. Variation de la vitesse de désamination en fonction de la quantité de cynuramine en absence (cercles blancs) et en présence (cercles noirs) de dopamine $3,3.10^{-4}$ M. La vitesse de désamination est mesurée par la méthode de WEISSBACH et coll. (1960). Mitochondries de foie humain. La quantité employée correspond à 0,6 mg de protéine.

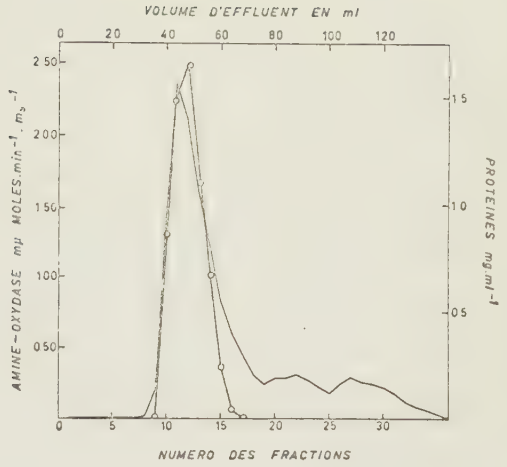


figure 11. Chromatographie sur Séphadex G 200 de la fraction mitochondriale M_p (50 mg de protéines) solubilisée par le DOC Na et les ultra-sons. Elution par un tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 7,6. Fraction de 4 ml. Colonne de 50 x 4 cm thermostatée à + 4°C environ.

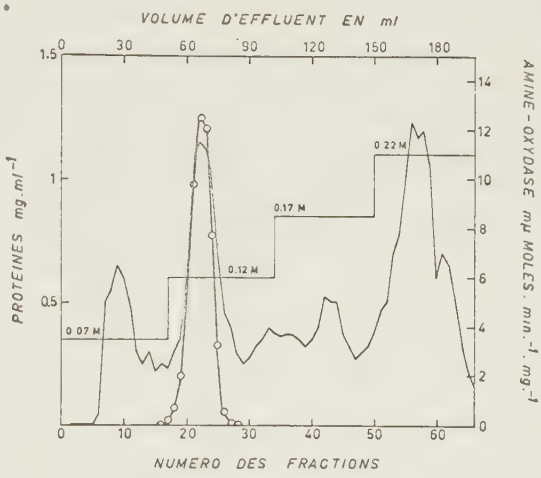


figure 12. Chromatographie sur DEAE Séphadex A 50 des protéines mitochondriales de cerveau humain solubilisées par action combinée des ultra-sons et du DOC Na. 100 mg de protéines renfermant 310 unités d'amine-oxydase sont appliquées sur une colonne de 30 cm de hauteur et 2 cm de diamètre équilibrée avec du tampon phosphate 0,07 M pH 7,6 Elution par du tampon phosphate contenant 10 p.mille (p/v) de DOC Na et un gradient discontinu de molarité représenté sur la figure. Fractions de 3 ml. Les protéines (trait noir continu) sont dosées selon LOWRY et coll. (1951), l'amine-oxydase (cercles blancs) selon WEISSBACH et coll. (1960). Le tube n° 22 a une activité spécifique d 10,86 soit un enrichissement de 27 fois.

Nous avons tenté de pousser plus loin la purification de l'amine-oxydase. La chromatographie sur DEAE cellulose permet d'obtenir un enrichissement mais malheureusement difficilement reproductible du fait, semble-t-il de la mauvaise conservation de l'enzyme en solution diluée. Nous avons essayé plusieurs types de dérivés dans le but de protéger l'enzyme contre la dénaturation : des substrats de l'amine-oxydase comme la tyramine, des substances complexant les métaux, comme le sel disodique de l'acide éthylène diamine tétra-acétique, des dérivés soufrés comme le glutathion, des coenzymes possibles comme le phosphate de pyridoxal, les flavine adénine mono et di nucléotides. Aucune de ces substances n'a donné d'amélioration notable des résultats. Nous avons utilisé de la DEAE Sephadex A 50 après équilibration dans le tampon phosphate de potassium 0.07 M pH 7,6 contenant 10 p. 1.000 de DOC Na. Le tableau VII et la figure 12 rapportent une purification de 20 fois obtenue dans ces conditions. Les études cinétiques qui sont décrites dans le chapitre IV ont été faites avec les trois préparations d'enzymes dont les caractéristiques sont données dans le tableau VIII.

TABLEAU VI

	Protéines mg	Enzyme Unités	Pourcentage d'enzyme récupéré	Activité spécifique	Enrichissement
Homogénat	2356	942.3	100	0.40	1
Fraction mitochondriale M_b	421.8	489.3	51.9	1.16	2.9
Fraction mitochondriale M_p	126	381.1	41	3.07	7.6
Solubilisation par le DOC Na 6 p 1000 et les ultra-sons. Centrifugation de 10^6 g.min. Surnageant	118.3	369.5	39 2	3.12	1.8
Surnageant dialysé contre du saccharose... et filtré sur Séphadex G 200	104.5	334 3	35.4	3.19	8
Fractions actives dialysées contre du saccharose Passage sur DEAE séphadex Elution par des tampons phosphate 0,07, 0,12, 0,17, 0,25 M pH 7,6 + DOC Na 10 p. mille	19.9	161	17.1	8	20

Purification de l'amine-oxydase de cerveau humain
Bilan des différentes étapes. Détails dans le texte

TABLEAU VIII

	Activité spécifique de l'homogénat	Caractéristiques de la préparation		
		Protéines mg	Enzyme Unités	Activité spécifique
Préparation enrichie 8,2 fois	0.47	48.3	186	3 85
Préparation enrichie 13,9 fois	0.41	39.7	226.5	5 70
Préparation enrichie 20 fois	0.40	19.9	161	8

Caractéristiques des trois préparations d'amine-oxydase employées au cours des études cinétiques du chapitre IV.

4. Préparation des mitochondries de foie humain et purification partielle de l'amine-oxydase.

Les mitochondries de foie humain sont préparées en appliquant le schéma de fractionnement par centrifugation différentielle qui est décrit dans la figure 13. La solubilisation de l'enzyme se fait par le procédé décrit page 38 pour les mitochondries du cerveau. La purification est obtenue par filtration sur colonne de Sephadex G 200 possédant les caractéristiques rapportées dans la légende de la figure 11. L'amine-oxydase apparaît dans les premières fractions - éluées par un tampon phosphate 0.01 M, pH 7,6 - sous forme d'un pic, séparé de la masse des protéines mitochondriales. On obtient d'emblée une purification de 2 à 3 fois ce qui, compte tenu de l'enrichissement dû à la préparation de la fraction mitochondriale, correspond à une activité spécifique 12 fois plus élevée que dans l'homogénat initial. Nous avons arrêté la purification à ce stade de façon à étudier, pour le cerveau, le foie et le rein, des préparations dont le stade d'enrichissement soit comparable. A la différence du cerveau, il est en effet possible d'obtenir avec l'enzyme hépatique un accroissement de 50 fois de l'activité spécifique initiale.

Wgr de foie additionnés
de 3 x Wml de saccharose 0,25 M,
homogénéisés au Potter.

centrifugation à 2200 rpm pendant 10 min.
Le culot est additionné de 3 x Wml de
saccharose 0,25 M, homogénéisé et
centrifugé à 1800 rpm pendant 10 min.
Cette opération est répétée 1 fois

Surnageants réunis
et portés à 10 x Wml
avec du saccharose 0,25 M
EXTRAIT CYTOPLASMIQUE.

culots = fraction nucléaire
(écartée.).

centrifugation à 12500 rpm
pendant 3 min. Le culot est mis
en suspension dans du saccharose 0,25 M
et centrifugé à 12500 rpm pendant
3 min. Cette opération est répétée 1 fois

Surnageants (écartés)

Culots =
FRACTION MITOCHONDRIALE

figure 13.
Schéma de fractionnement par centrifugation fifférentielle utilisé pour préparer la fraction mitochondriale de foie humain.

5. Préparation des mitochondries de rein humain et purification partielle de l'amine-oxydase.

La fraction mitochondriale est obtenue après séparation par centrifugation différentielle d'une fraction "brute" qui est ensuite "purifiée" sur un gradient discontinu de densité (figure 14). Un enrichissement de 10 fois par rapport à l'homogénat initial est obtenu par les procédés de solubilisation et de filtration sur Séphadex décrits pour l'amine-oxydase des mitochondries de foie humain.

Wgr de rein additionnés
de 3 x Wml de saccharose 0,25 M
homogénéisés au Potter.

centrifugation à 2200 rpm pendant 10 min.
Le culot est additionné de 3 x Wml de
saccharose 0,25 M, homogénéisé et
centrifugé à 1800 rpm pendant 10 min.

Surnageants réunis
et portés à 10 x Wml
avec du saccharose 0,25 M
= EXTRAIT CYTOPLASMIQUE.

Culots = fraction nucléaire
(écartée)

centrifugation à 25000 rpm
pendant 6'42".

Surnageant (écarté).

Culot mis en suspension
dans du saccharose 0,25 M
et déposé au sommet
d'un gradient de densité
discontinu

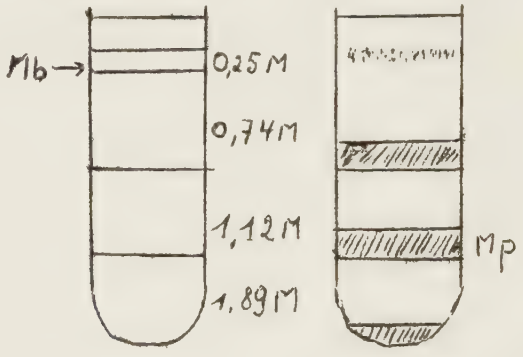


figure 14.

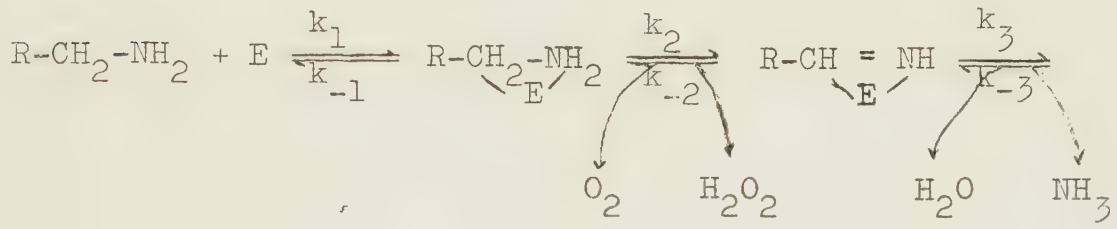
Schéma de fractionnement par centrifugation différentielle utilisé pour préparer la fraction mitochondriale brute de rein humain. La fraction brute est purifiée sur le gradient discontinu de densité schématisé en bas et à droite de la figure. 9 ml de culot mis en suspension dans du saccharose 0,25 M (M_b) sont déposés à la surface du gradient composé de trois couches de 18 ml de saccharose respectivement 0.74, 1,12 et 1,89 M, correspondant aux densités 1,10, 1,15 et 1,25 à 0° C. Centrifugeuse Spinco Beckman modèle L_2, rotor SW 25.2,25 000 rpm pendant 180 min. ($13,6.10^6$ g.min.). Dessin de gauche: position des couches avant centrifugation. Dessin de droite: aspect du tube après centrifugation. M_p = fraction mitochondriale purifiée.

CHAPITRE IV

Ce chapitre ainsi que le suivant est consacré à l'étude comparative des enzymes dont la purification vient d'être décrite. L'étude cinétique postule une réaction de désamination en quatre étapes (paragraphe 1). On détermine la constante de MICHAELIS MENTEN (paragraphe 2), la variation de la vitesse initiale en fonction du pH (paragraphe 3), la chaleur d'activation du complexe enzyme-substrat (paragraphe 4), la spécificité des enzymes vis-à-vis de différents substrats (paragraphe 5) et inhibiteurs (paragraphe 6). Les résultats rapportés dans ce chapitre sont repris et commentés dans le chapitre V.

1) Considérations sur l'étude cinétique de la désamination oxydative.

Nous avons vu que la réaction de désamination de la cynuramine par l'amine-oxydase se déroule selon le schéma de la figure 2. L'amine se transforme en un imino-dérivé qui est hydrolysé en aldéhyde. On peut, raisonnablement, postuler les étapes suivantes :



$$R\text{-}CHO \underset{E}{} \underset{k_{-4}}{\overset{k_4}{\rightleftharpoons}} R\text{-}CHO + E \qquad \text{IV 1}$$

E désigne l'enzyme, $R\text{-}CH_2\text{-}NH_2$, le substrat, R-CHO, l'aldéhyde qui in vivo se transforme en acide par une autre réaction enzymatique (voir page 6) k_1, k_{-1}, k_2, k_{-2}, k_3, k_{-3}, k_4, k_{-4}, sont les constantes des vitesses des processus d'association et de dissociation représentés par les flèches. Nous supposons que la réaction comporte trois complexes intermédiaires. On peut cependant, en première approximation, la ramener à

$$R\text{-}CH_2\text{-}NH_2 + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} R\text{-}CH_2\text{-}NH_2 \underset{E}{} \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} R\text{-}CHO + E \qquad \text{IV 2}$$

De plus, comme on ne considère dans nos mesures que la vitesse initiale, on peut admettre qu'il n'y a que très peu de produit formé, suffisamment, cependant, pour faire nos mesures, d'autant que le coefficient d'extinction molaire est élevé. On peut donc négliger la réaction k_{-2}.

La réaction globale se simplifie ainsi :

$$R\text{-}CH_2\text{-}NH_2 + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} R\text{-}CH_2\text{-}NH_2 \text{ (E)} \xrightarrow{k_2} R\text{-}CHO + E \qquad \text{IV 3}$$

La constante de dissociation apparente du complexe cynuramine-amine-oxydase est

$$K_m = \frac{(E)\,(S)}{(ES)} \qquad \text{IV 4}$$

Cette égalité peut encore s'écrire :

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \qquad \text{IV 5}$$

Si l'on admet que dans la majorité des systèmes, k_{-1} et k_1 sont très grands par rapport à la vitesse d'apparition du produit k_2, on peut négliger ce dernier et écrire :

$$K_m = K_s \qquad \text{IV 6}$$

C'est-à-dire que la constante de dissociation est égale à la constante d'équilibre du complexe enzyme-substrat et que l'on est dans les conditions idéales pour l'étude cinétique des enzymes. Il faut pour cela travailler à saturation de substrat. Nous allons donc déterminer la concentration de cynuramine nécessaire pour saturer nos enzymes.

2) Détermination de la constante de MICHAELIS

Dans les conditions de température, de pH et d'ionisation définies page 24, nous étudions la variation de la vitesse en fonction de la quantité de substrat. Pour chacun des trois enzymes, nous décomposons la détermination du K_m en deux étapes: un essai rapide permettant de situer l'ordre de grandeur de la constante, un essai définitif dans lequel nous choisissons, en fonction du résultat précédent, les concentrations de substrat qui permettront d'obtenir un résultat aussi précis que possible. Par exemple, pour l'amine-oxydase extraite du cerveau, une première expérience, montre que l'allure de la courbe est tout à fait classique (figure 15a). Quand on ajoute des quantités croissantes de cynuramine, la vitesse augmente jusqu'à atteindre un plateau. A ce moment, tout l'enzyme présent dans le milieu est saturé et la vitesse de la réaction a atteint sa valeur maximum. La représentation du même phénomène selon LINEWEAVER et BURK (figure 15b) montre que le K_m de l'enzyme est de 5.10^{-5} Môle par litre.

A partir de ces données préliminaires, nous avons refait une expérience dans laquelle les concentrations en substrats ont été calculées de façon à avoir des points répartis à des intervalles réguliers allant de $\frac{Km}{3}$ à 5 Km (figure 16). Nous avons encore adopté la représentation de LINEWEAVER et BURK mais au lieu de prendre l'inverse de la concentration en substrat comme variable indépendante, et l'inverse de la vitesse comme variable dépendante, on porte S en abscisse et $\frac{S}{V}$ en ordonnée. Ce mode de représentation est plus précis que celui de la figure 15 car le facteur qui est connu avec le plus d'exactitude est (S). L'erreur brute finale sur (S) n'excède pas 1 %.

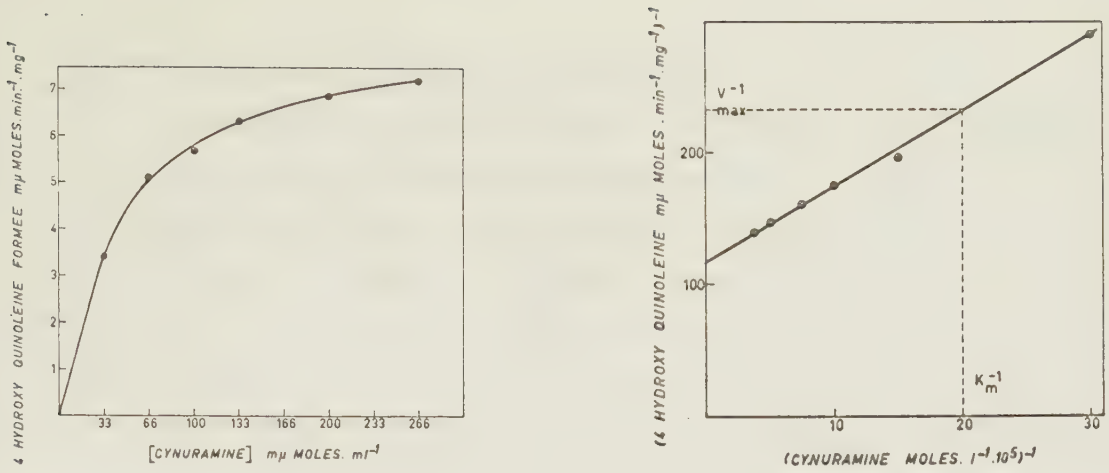


figure 15. Amine-oxydase des mitochondries de cerveau humain. Variation de la vitesse de la réaction de désamination en fonction de la quantité de substrat. a) Coordonnées directes. b) Coordonnées inverses. 0,26 mg d'enzyme purifié 14 fois.

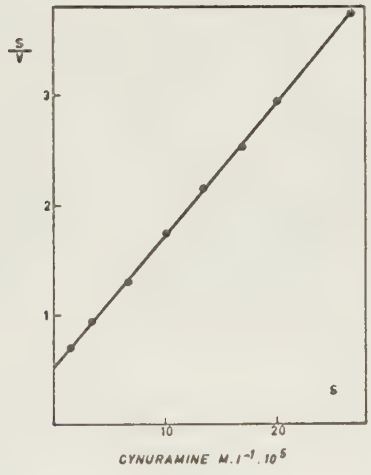


figure 16. Amine-oxydase des mitochondries de cerveau humain. Variation de la vitesse de la réaction en fonction de la quantité de substrat. 0,8 mg d'enzyme purifié 14 fois Km = $4,3.10^{-5}$ $M.l^{-1}$. Vmax = 8,26 mumoles $min^{-1}.mg^{-1}$.

La figure 16 rapporte les résultats de la détermination du K_m de la monoamine-oxydase des mitochondries de cerveau humain. Il est, dans les conditions opératoires décrites, de $4,3.10^{-5}$ Môles par litre avec une vitesse initiale maximum de 8,26 mμmôle. $min^{-1}.mg^{-1}$. Pour le foie et le rein nous avons trouvé, respectivement : $K_m = 1,05.10^{-4}$M et Vmax = 76,92 mμmôles. $min^{-1}.mg^{-1}$. (enzyme purifié 12 fois, 0,6 mg de protéines); $K_m = 1,25.10^{-4}$M et Vmax = 72,63 mμmôles. $min^{-1}.mg^{-1}$. (enzyme purifié 10 fois, 0,7 mg. de protéines) une inhibition par excès de substrat apparaît à partir de la concentration 0,3 mM. Nous travaillons à des concentrations de cynuramine de $3,3.10^{-4}$ Môles par litre lorsque nous mesurons l'apparition du produit formé, et de 10^{-4} Môles par litre lorsque c'est la disparition du substrat qui est observée. Ces quantités correspondent respectivement à 8 et 2 Km dans le cas de l'enzyme du cerveau mais seulement à 3,2 ou 1 Km dans le cas du foie ou du rein. Il n'est pas possible d'augmenter les quantités de cynuramine dans le test à cause de sa forte absorption aux longueurs d'onde utilisées. Il faut donc raccourcir la durée de la réaction et observer attentivement l'allure des courbes pour détecter les éventuelles anomalies caractéristiques de l'insuffisance en substrat. Moyennant ces précautions, nous n'avons jamais, au cours de nos mesures, consommé plus de 12 % du substrat présent.

3) Influence du pH sur la réaction de désamination.

Nous avons, dans ces conditions, étudié la variation de la vitesse initiale en fonction du pH du milieu d'incubation, c'est-à-dire, en fonction de l'ionisation du substrat et peut-être des sites actifs de l'enzyme. En ce qui concerne ce dernier, nous supposons dans tout ce qui suit que l'équilibre entre la forme ionisée de la protéine et l'ion hydrogène est atteint avec une vitesse infiniment supérieure aux vitesses d'association et de dissociation du complexe ES. Cette simplification est, en général, admise pour toutes les études du type de celle que nous avons entreprise et l'examen de nos résultats expérimentaux ne nous a donné aucune raison de douter de sa justification.

Les mesures ont été faites en tampon phosphate de potassium (50 mM). La cynuramine est stable à tous les pH étudiés. On constate une légère augmentation de sa DO entre pH 8,5 et 9,5, augmentation qui est de l'ordre de 11 %, et pour laquelle nous avons introduit un facteur de correction dans le calcul des vitesses initiales.

Si nous voulons travailler dans les conditions idéales de la cinétique, nous devons opérer en présence d'une quantité saturante de substrat. Nous venons de déterminer cette quantité à pH 7,4. Une rapide détermination de la variation de la vitesse en fonction du pH nous montre que l'optimum se trouve à des pH alcalins probablement vers pH = 9. C'est-à-dire que plus nous allons nous approcher de cette valeur, plus l'enzyme va consommer de substrat par unité de temps. Il est évident que le Km va changer et nous risquons de mesurer, d'abord la variation de la vitesse, puis celle du Km. Pour éviter cette erreur, nous devons soit déterminer le K_m à différents pH, soit faire plusieurs déterminations avec des quantités croissantes de substrat. Nous aurons ainsi les conditions dans lesquelles tout l'enzyme sera sous forme de complexe intermédiaire ES. On mesure alors

la vitesse, c'est-à-dire, la transformation : $ES \xrightarrow{k_2} E + P$.
L'effet du pH sur la vitesse est dû principalement à l'état d'ionisation du complexe ES. Des changements dans l'état d'ionisation de l'enzyme libre ou du substrat libre n'affecteront pas V mais K_m. Les effets sur K_m doivent donc être éliminés en mettant toujours du substrat en concentration saturante, ce qui - comme nous l'avons dit plus haut - pose des problèmes dans le cas du foie et du rein. Nous avons donc contrôlé les résultats des déterminations spectrophotométriques en refaisant les courbes par la méthode de BAUDHUIN et coll., (1964) dans laquelle la quantité de substrat peut atteindre près de 40 Km dans les conditions les moins favorables. L'étude des courbes montre pour l'enzyme du cerveau un optimum d'activité entre pH 8 et 9,2. (figure 17).

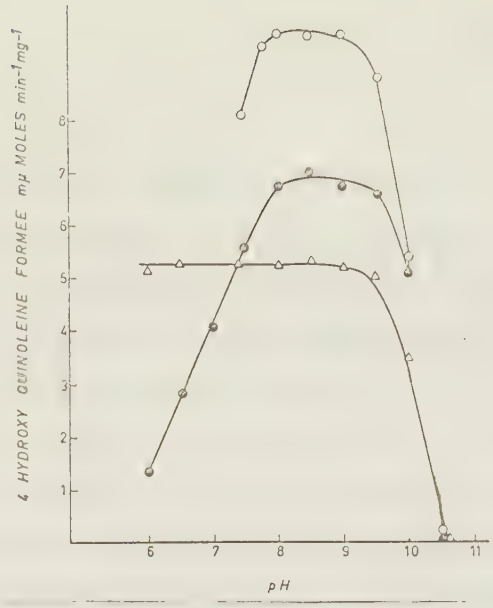


figure 17. Activité et stabilité de l'amine-oxydase des mitochondries de cerveau humain en fonction du pH. Tampon phosphate 50 mM. Cercles noirs : enzyme purifié 14 fois. Cercles blancs : enzyme purifié 20 fois. Triangles : enzyme purifié 20 fois incubé 10 minutes à 37°C aux différents pH puis dosé dans les conditions standards.

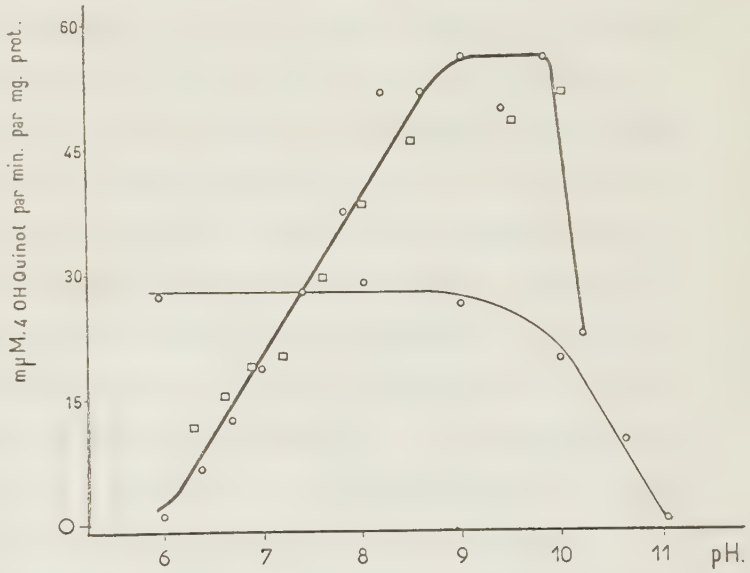


figure 18. Activité et stabilité de l'amine-oxydase des mitochondries de foie humain en fonction du pH. Tampon phosphate 50 mM. Courbe en trait fort : Les cercles et les carrés correspondent à deux expériences indépendantes (enzyme enrichi 12 fois, activité spécifique 28.3). Courbe en trait fin : enzyme incubé 10 minutes à 37°C aux différents pH puis dosé dans les conditions standards.

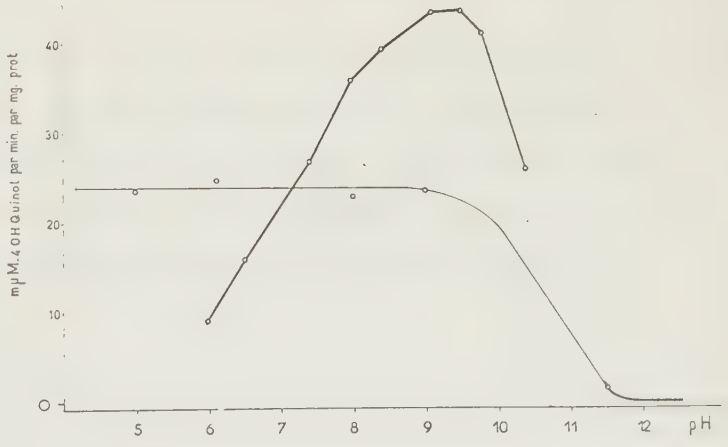


figure 19. Activité et stabilité de l'amine-oxydase des mitochondries de rein humain en fonction du pH. Tampon phosphate 50 mM. Courbe en traits forts : activité en fonction du pH. Courbe en traits fins : enzyme incubé 10 minutes à 37°C aux différents pH puis dosé dans les conditions standards.

Cet optimum a la forme d'un plateau presque horizontal. Puis l'augmentation vers les pH très alcalins provoque une baisse rapide de la vitesse. A pH 10 la vitesse n'est plus que 60 % de celle enregistrée vers pH 9. A pH 10,5 la vitesse est presque 0. La vitesse s'annule pour un pH compris entre 10,5 et 11.
Nous avons tenté de déterminer si cette baisse de la vitesse était due à une altération du substrat, de l'enzyme ou à la combinaison de ces deux facteurs. La stabilité de la cynuramine aux pH intéressés n'est pas en cause comme nous l'avons vu plus haut. Nous avons donc testé l'enzyme. Nous avons incubé l'enzyme à 37°C avec du tampon phosphate de K (50 mM) à différents pH. La figure 17 montre le résultat de cet essai. L'enzyme est inactivé à pH 10.6. Cette inactivation est irréversible si le contact entre l'enzyme et le milieu alcalin est suffisamment prolongé. Si la durée de contact n'est que de 10 minutes, comme dans notre expérience, une dialyse d'une heure contre de l'eau distillée restaure 50 % de l'activité initiale (dosage à pH 7.4 dans les conditions standards définies, page 25). L'amine-oxydase de foie présente une courbe d'activité en fonction du pH dont le maximum se situe entre 8,9 et 9,9. A pH 10,5 la vitesse tombe au quart de sa valeur optimum. Elle devient proche de 0 à pH 11.(figure 18).
Par rapport à l'enzyme du cerveau, il y a donc un déplacement du maximum vers les pH alcalins et une plus grande résistance de la protéine à la dénaturation alcaline. Cette dernière tendance s'accentue avec l'enzyme du rein. Le maximum se situe entre 8,9 et 9,5 mais la vitesse ne s'annule qu'entre pH 11,5 et 12. (figure 19).

Ces résultats constituent un élément important pour l'identification des enzymes que nous avons purifiés. Ils recoupent les données de différents auteurs (HARE, 1928, MAC EWEN et coll., 1966) concernant des amine-oxydases d'autres origines et qui concluent que le maximum d'activité se situe entre pH 8 et pH 9.

4) Variation de la vitesse initiale de désamination en fonction de la température d'incubation.

L'étude de la variation de la vitesse initiale en fonction de la température d'incubation a été faite selon les mêmes principes que celle de la variation de l'activité en fonction du pH. Nous avons vérifié la stabilité du substrat aux différentes températures. Les dosages sont faits dans les conditions standards définies page **24.** Seule la température varie. L'eau, le tampon et le substrat sont préincubés à la température de l'essai. Celle-ci est contrôlée à l'aide d'un thermocouple. La tolérance admise est de $\pm$ 0,1°C. Les résultats sont représentés graphiquement en coordonnées directes (figure 20) ou selon le mode d'ARRHENIUS (figure 21).

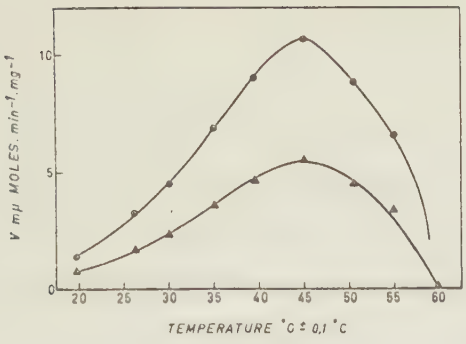


figure 20. Amine-oxydase des mitochondries de cerveau humain. Variation de la vitesse de désamination de la cynuramine en fonction de la température d'incubation. Coordonnées directes. Cercles noirs : enzyme purifié 20 fois. Triangles: enzyme purifié 14 fois.

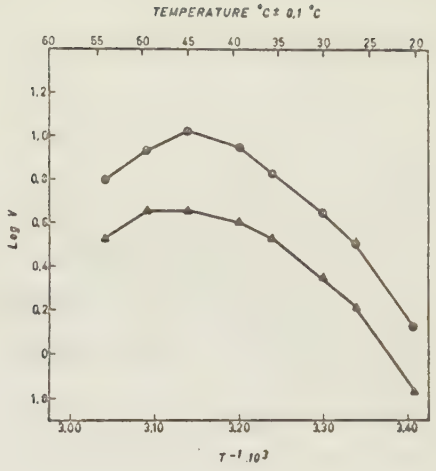


figure 21. Amine-oxydase des mitochondries de cerveau humain. Variation de la vitesse initiale de désamination de la cynuramine en fonction de la température d'incubation. Représentés selon le mode d'ARREHNIUS. Cercles : enzyme purifié 20 fois. Triangles : enzyme purifié 14 fois.

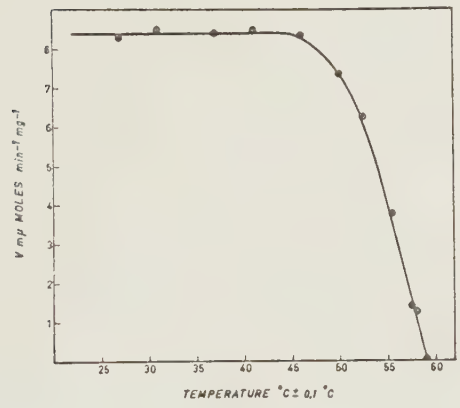


figure 22. Amine-oxydase des mitochondries de cerveau humain. Stabilité de l'amine-oxydase vis-à-vis de la température. Préincubation de 10 minutes aux températures indiquées. Refroidissement par immersion dans de l'eau glacée. Dosage à 37°C dans les conditions standards.

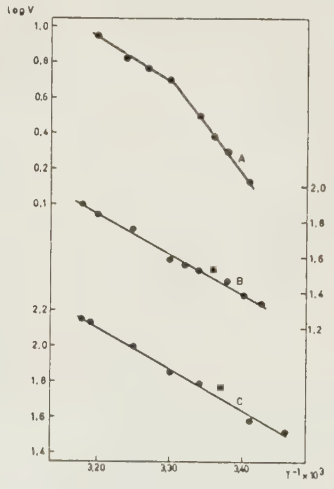


figure 23. Variation de la vitesse initiale de la désamination de la cynuramine en fonction de la température d'incubation entre 20 et 40°C. Représentation selon ARRHENIUS. Amine-oxydase des mitochondries de cerveau (a), de foie (b), de rein humains (c).

Notons que le substrat ne protège pas l'enzyme contre l'action dénaturante de la température. En effet, nous avons dans les conditions de la figure 22, incubé l'enzyme en présence de cynuramine (5mM). Après dialyse jusqu'à élimination du substrat, on ne retrouve aucune activité dans les conditions standards de dosage. Entre 30 et 40° C l'enzyme a un Q 10 de 2,05.

Le mode de représentation découvert empiriquement par ARRHENIUS pour les réactions chimiques puis adapté par extension au cas des réactions enzymatiques, établit une relation linéaire entre le logarithme décimal de la vitesse de réaction et l'inverse de la température absolue. Remarquons cependant, qu'aucune raison théorique ne permet de supposer un tel résultat et on voit sur la figure 21 que les représentations graphiques sont en fait des segments de courbe. La variation de la vitesse initiale en fonction de la température est un phénomène complexe qui fait intervenir le nombre de molécules à l'état activé d'une part, et la dénaturation thermique de la protéine, d'autre part. C'est pourquoi, on doit, pour obtenir une réaction linéaire, se placer dans un domaine de température où le deuxième phénomène est insensible, c'est-à-dire, en pratique, entre 20 et 40° C. Dans ces conditions, nous avons obtenu dans le cas de l'amine-oxydase des mitochondries de cerveau humain une relation dont la représentation graphique (figure 23 a) permet de calculer l'énergie d'activation du complexe enzyme-substrat qui est de 11,7 kilo-calorie par mole entre 30 et 40° C et de 23,7 kilo-calorie par mole entre 20 et 30° C.

Pour le foie et le rein, la représentation en coordonnées directes de la variation de l'activité en fonction de la température d'incubation est une courbe présentant un maximum à 45° C. Cependant un deuxième sommet apparaît à 28° C (entre 27 et 29° C selon les expériences). Sa valeur est la moitié de celle de l'optimum à 45° C. Ce deuxième pic, qui pourrait correspondre à un deuxième enzyme ou à une autre forme de l'enzyme ne disparaît pas si la préparation est pré-chauffée à 37 ou 45° C pendant 30 minutes, ou additionnéede semi-carbazide mM. Mais si l'essai est fait en présence de cyanure de potassium 10 mM, on ne trouve plus que le maximum à 45° C. La représentation selon ARREHNIUS est une droite dont la pente entre 20 et 40° C équivaut à une chaleur d'activation de 10,7 kilo-calorie par mole pour le foie et 10,3 pour le rein. En présence de cyanure de potassium 10 mM, on trouve 12,0 kilo-calories pour le foie. Cette valeur est ramenée à 10,7 (10,65 exactement) si le milieu contient, en plus du cyanure, de la semi-carbazide mM. L'interprétation de ces résultats sera donnée dans le chapitre V.

5) Spécifité vis-à-vis des substrats.

La spécifité n'a été étudiée extensivement que dans le cas de l'enzyme du cerveau afin de savoir s'il attaque les catécholamines et la sérotonine qui sont les substrats physiologiques. Pour comparer les différents substrats nous avons utilisé la méthode colorimétrique de BAUDHUIN et coll.,(1964). Le tableau IX montre que l'enzyme a une spécifité qui l'identifie sans ambiguité à la monoamine-oxydase. Les résultats seront commentés plus en détail ultérieurement.

TABLEAU IX

Substrats	Activité spécifique en mμmôles.min^{-1}.mg^{-1}. Moyennes de 3 déterminations ± écart type sur la moyenne.
5 hydroxy tryptamine créatinine sulfate (1)	13,46 ± 1,53
Tryptamine, chlorhydrate (5)	12,50 ± 1,78
Tyramine, chlorhydrate (4)	10,48 ± 0,79
Cynuramine, dilbromhydrate (1,2)	7,96 ± 0,24
Dopamine, chlorhydrate (1)	4,17 ± 1,45
L noradrénaline, d bitartrate (4)	0,86 ± 0,23
L adrénaline, chlorhydrate (1)	0,36 ± 0,05
DL métadrénaline, chlorhydrate (1)	0,03 ± 0,01
DL métanoradrénaline	0,03 ± 0,02
Spermidine, trichlorhydrate (3)	0
Spermine, tétrachlorhydrate (3)	0
Cadavérine dichlorhydrate (5)	0
Putrescine, dichlorhydrate (5)	0
Histamine, dichlorhydrate (5)	0
1,4 méthyl histamine, dichlorhydrate (3)	0

(1) Sigma Chemical Cy, (2) Regis Chemical Cy, (3) Calbiochem, (4) Sterling Winthrop, (5) Mann Research Laboratories.

Spécificité de l'amine-oxydase des mitochondries de cerveau humain. Préparation purifiée 20 fois.

6) Spécificité vis-à-vis des inhibiteurs.

Pour compléter l'analyse des propriétés de l'enzyme isolé du cerveau, nous avons étudié son activité en présence de deux IMAO classiques : l'isopropyl hydrazine (1) et la trans 2 phényl cyclo propyl amine (2). Ces deux dérivés sont dissous dans l'eau distillée. La solution est neutralisée et ajoutée à l'enzyme en milieu tamponné. Après une pré-incubation de 15 min. à 37° C on ajoute le substrat (sérotonine créatinine sulfate) et l'amine-oxydase est dosée par la méthode de BAUDHUIN et coll., (1964). Les deux IMAO essayés ont un effet marqué sur l'enzyme isolé; la concentration réduisant de 50 % la vitesse initiale de désamination de la sérotonine est de $3,5.10^{-5}$ M pour l'isopropyl hydrazine et de $0,8.10^{-6}$ M pour la trans 2 phényl cyclo propyl amine.

Dans le but, non plus d'identifier l'enzyme, mais d'avoir quelques renseignements sur la nature de son site actif, nous avons observé l'activité désaminante sur la sérotonine en présence de quatre dérivés. A la concentration mM aucun effet inhibiteur de la cystéine, du cyanure de potassium, de la semi carbazide, du sel disodique, de l'acide éthylène diamine tétra acétique ne s'est manifesté.

---

(1) Phosphate d'iproniazide Hoffman Laroche

(2) Tranylcypromine.

CHAPITRE V

Ce chapitre est consacré à la discussion de nos résultats expérimentaux.

La découverte de l'amine-oxydase par MLC HARE (1928) est l'aboutissement d'une longue série de travaux qui avaient pour but d'élucider le sort des amines biologiques chez les mammifères (SCHMIEDEBERG, 1887, 1881, MINKOWSKI, 1883, MOSSO, 1889, EWINS et LAIDLAW, 1910, 1913, GUGGENHEIM et LOFFLER, 1916). Par la suite, on rapporte l'existence d'enzymes désaminants dans divers organes de mammifères, (BEST, 1929, BLASCHKO et coll., 1937 a et b, KOHN, 1937, PUGH et QUASTEL, 1937 a et b, RICHTER, 1937), ou d'autres espèces animales ou végétales (BLASCHKO, 1941, BLASCHKO et HAWKINS, 1952, KENTEN et MANN, 1952, BLASCHKO et HIMMS, 1953, 1954, BLASCHKO et coll., 1961). Lorsque ZELLER décrit en 1952 l'effet inhibiteur de l'iproniazide sur la MAO l'intérêt des pharmacologues se tourne vers cet enzyme. Les prospections évoluent alors dans deux directions principales : d'une part, on recherche l'action inhibitrice éventuelle d'un grand nombre de dérivés. En effet, les IMAO font partie du domaine thérapeutique pour leurs effets "tranquilisants". L'augmentation du nombre des psychoses dûes aux conditions de la vie moderne explique le succès immédiat et fort étendu de ces drogues. D'autre part, les biochimistes s'efforcent de purifier l'enzyme afin d'étudier le mode d'action des substrats et des inhibiteurs, et de définir son rôle physiologique que l on soupçonne très important. L'amine-oxydase est fortement liée à des structures cellulaires. Les premiers travaux n'aboutissent qu'à des purifications très partielles (BARSKY et coll., 1953, COTZIAS et coll., 1954, MANN, 1955, HARRIS, 1960, GORKIN, 1963 BARBATO et ABOOD, 1963, COQ et BARON, 1964). Les préparations obtenues sont peu actives et instables. Mais le plasma des mammifères ainsi que le cytoplasme de certaines cellules renferment des enzymes désaminant sous

forme soluble. Avec les progrès de la chromatographie et des techniques de purification des protéines en général, on est parvenu à obtenir des préparations plusieurs centaines à plusieurs milliers de fois plus actives. (TABOR et coll., 1954, MANN, 1960, WERLE et coll., 1961, YAMADA et YASUNOBU, 1962, KAPPELER-ADLER et MAC FARLANE, 1963, GORYACHENKOVA et ERSHOVA, 1963, MONDOVI et coll., 1964, BUFFONI et BLASCHKO, 1965, MAC EWEN, 1965 a, MAC EWEN et coll., 1966). Pour l'amine-oxydase, liée aux mitochondries, il faudra attendre le perfectionnement des méthodes de solubilisation des enzymes de la paroi mitochondriale. (GUHA et KRISHNA-MURTI, 1965, NARA et coll., 1966, GABAY et coll., 1966, KLYASHTORIN et coll., 1966, YOUDIM et SOURKES, 1966).

Le but de nos travaux sur la désamination oxydative dans le cerveau, le foie et le rein n'est pas tant d'obtenir des préparations hautement purifiées, que des enzymes libérés des éléments pouvant interférer dans la cinétique de la réaction, et de les comparer. Une étude sur des tissus humains comporte la très grande difficulté de se procurer des fragments d'organes prélevés extemporanément. Cela est particulièrement vrai lorsqu'il s'agit de cerveau humain, et nous devons exprimer notre gratitude aux médecins et neurochirurgiens qui nous ont permis de surmonter cette difficulté.

Notre méthode de fractionnement, en recourant à l'utilisation du gradient de densité nous a permis d'obtenir pour la purification de l'enzyme, une préparation relativement riche en amine-oxydase. En effet, la fraction mitochondriale M_p est 7,6 fois plus active que l'homogénat (Tableau VII). Le seul auteur, à notre connaissance, qui ait tenté de purifier l'amine-oxydase du cerveau de mammifère est NAGATSU (1966).

Partant de mitochondries moins purifiées il n'obtient finalement qu'un enrichissement de 6 fois. L'instabilité de l'enzyme, vraisemblablement en rapport avec la fragilité du tissu nerveux, est un obstacle à un enrichissement plus poussé.
La MAO purifiée se conserve mal.
Après 3 jours à + 4° C les préparations accusent une baisse d'activité de 60 % environ. Après congélation à -20 ou -55° C la solution présente des floculats blanchâtres dont nous attribuons la formation à la dénaturation des lipoprotéines à basse température. Nous avions rencontré le même phénomène avec une monoamine-oxydase purifiée 6 fois à partir du surnageant de foie de cobaye. (AMAR-COSTESEC et BOHUON, 1965).

Si nous comparons les Km de la monoamine-oxydase des mitochondries de cerveau humain avec ceux du tableau X, nous voyons que le résultat se situe parmi les valeurs les plus basses citées dans la littérature. Les concentrations de l'ordre de 10^{-5} M ne se rencontrent qu'avec un enzyme hautement purifié (MAC EWEN, 1965 b) ou avec la cynuramine dont l'affinité pour l'amine-oxydase semble très élevée (GABAY et coll., 1966). Pour un même enzyme, le site actif a dix fois moins d'affinité pour une diamine que pour les deux monoamines testées. (MAC EWEN, 1965 b). D'autre part, la monoamine-oxydase des mitochondries de cerveau de boeuf a cinquante fois moins d'affinité pour la cynuramine que celle de cerveau humain. (NAGATSU, 1966).
Il est pourtant tout à fait remarquable que nous n'ayons pas trouvé pour cet enzyme l'inhibition par excès de substrat que nous avons rencontrée dans le foie et le rein (fig.21) et que

TABLEAU X

Source	Enzyme	substrat	Km mM	Références.
foie de rat	mitochondries	tyramine	3	DAVISON , 1957.
foie de lapin	extrait cytoplasmique	dopamine	2,90	ALLES et HEEGARD, 1943.
foie de cobaye	mitochondries	sérotonine	2,70	OSWALD et STRITTMATTER, 1963.
cerveau de boeuf	enzyme purifié 6 fois	cynuramine	2,70	NAGATSU, 1966.
rein de cobaye	mitochondries	sérotonine	1,90	OSWALD et STRITTMATTER, 1963.
foie de rat	"	benzylamine	1,80	"
foie de cobaye	"	tyramine	1,60	"
foie de rat	"	sérotonine	1,40	"
"	"	tyramine	0,85	"
foie de lapin	extrait cytoplasmique	amylamine	0,80	ALLES et HEEGARD, 1943.
"	" "	phényl éthyl amine	0,63	"
foie de porc		tyramine	0,50	KOHN, 1937
foie de rat		"	0,45	TAKAGI et GOMI, 1966.
plasma humain	enzyme purifié 5000 fois	octane-diamine	0,44	MAC EWEN, 1965b.
thyroïde de boeuf	microsomes	tyramine	0,40	FISCHER et coll. 1966.
rein de cobaye		tyramine	0,32	OSWALD et STRITTMATTER, 1963.
foie de lapin	mitochondries	cynuramine	0,085	GABAY et coll., 1966
foie de cobaye	poudre acétonique de mitochondries	"	0,044	AMAR-COSTESEC, non publié
plasma humain	enzyme purifié 5000 fois	"	0,043	MAC EWEN, 1965b.
" "	"	benzylamine	0,033	"

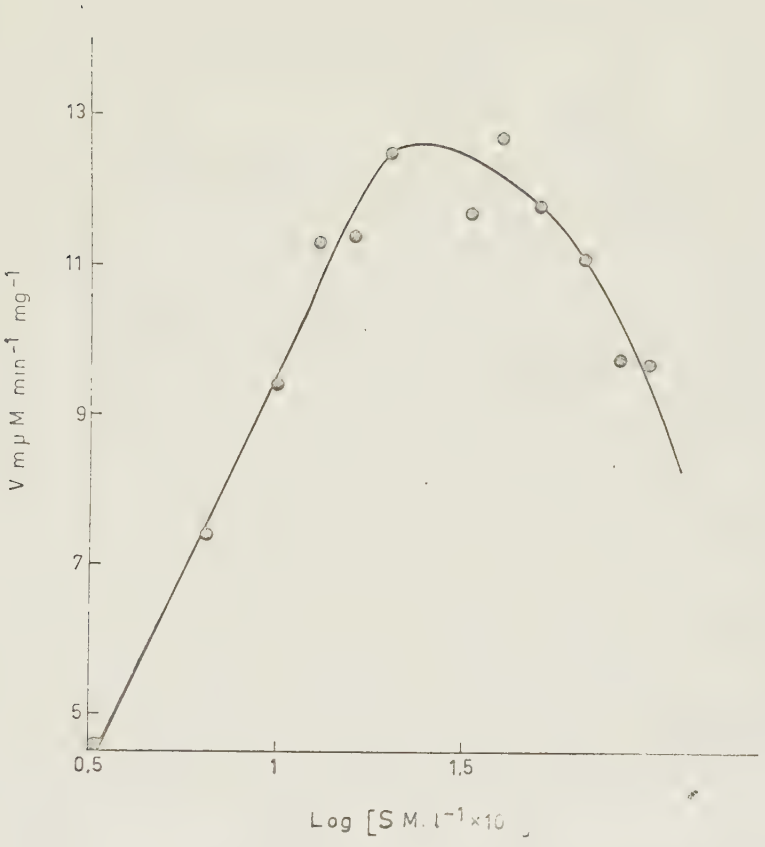


figure 24. Inhibition par excés de substrat dans le cas de l'amine-oxydase des mitochondries de foie humain. La quantité d'enzyme correspond à 0,6 mg de protéines. Substrat: cynuramine.

d'autres auteurs signalent pour des amine-oxydases d'autres origines. (MAC EWEN, 1965 b, MAC EWEN et coll., 1966, TAKAGI et GOMI, 1966). On sait qu'un certain nombre d'enzymes comme la désoxyribonucléase acide des lysosomes de foie de rat, la - glycuronidase du sérum humain (FISHMAN et coll., 1967), la carboxyl estérase du foie de veau (MURRAY, 1930), n'obéissent à la loi de MICHAELIS qu'aux faibles concentrations de substrat. Aux fortes concentrations, la variation de la vitesse devient une fonction décroissante complexe de la quantité de substrat. On suppose que ces enzymes possèdent deux points d'attache auxquels le substrat doit être fixé. Ce serait précisément le cas pour l'amine-oxydase (MAC EWEN et coll., 1966). Lorsque le nombre de molécules de substrat dans le milieu dépasse une certaine valeur, les sites de la protéine, au lieu de fixer une seule molécule de substrat, en fixeraient une à chacun des points d'attache. L'enzyme, bien qu'étant combiné au substrat, est sous forme d'un complexe inactif que nous figurons ci-dessous par ES'. A partir d'une certaine concentration, le substrat se comporte donc comme un inhibiteur compétitif vis-à-vis de la réaction à laquelle il prend part en tant que substrat. Les équations ci-dessous donnent une idée plus claire du phénomène. Avant la concentration critique, on a comme dans toute réaction enzymatique classique :

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad V\ 1$$

Après cette concentration on a, à la fois :

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad V\ 2$$

et

$$E + S \underset{k'_{-1}}{\overset{k'_1}{\rightleftharpoons}} ES' \qquad V\ 3$$

Posons $K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}$ (k_2 étant négligé selon la convention de la page 51)

et $$K'_s = \frac{k'_{-1}}{k'_1} \qquad V\ 4$$

$$K_s = \frac{E - (ES + ES')}{ES} \qquad V\ 5$$

$$K'_s = \frac{(ES)\ (S)}{(ES')} \qquad V\ 6$$

Le rapport entre ces deux constantes est appelé constante d'inhibition relative :

$$r = \frac{K'_s}{K_s} \qquad V\ 7$$

Dans une étude sur la mono amine-oxydase du foie de rat, TAKAGI et GOMI (1966) trouvent, dans le cas de la tyramine, un rapport de :

$$r = \frac{K'_s}{K_s} = \frac{10^{-2}\ M}{4{,}5 \cdot 10^{-4}\ M} \qquad V\ 8$$

$$r = 22{,}2$$

Nous avons tenté d'appliquer le traitement ci-dessus au cas de l'amine-oxydase du foie et du rein. Mais il ressort de nos expériences que la cinétique de l'inhibition par excès de substrat est d'ordre supérieur à 1 pour les enzymes étudiés et que la détermination d'une constante telle que K'_s est dépourvue de sens.

La variation de la vitesse initiale en fonction du pH est un élément important pour caractériser la monoamine-oxydase. Tous les auteurs s'accordent pour situer le maximum d'activité entre pH 8 et 9 (HARE, 1928, MANN, 1955), ce qui correspond aux résultats que nous avons obtenus aussi bien dans le cerveau que dans le foie ou le rein. L'enzyme est très instable à partir de pH 9 ce qui est également en accord avec les données de la littérature (HARE, 1928). L'augmentation d'activité aux pH alcalins s'explique par le fait que la cynuramine est ionisable et que l'amine-oxydase attaque préférentiellement une des formes de la molécule que l'on peut écrire : $R - CH_2 - NH_3^+$

En effet, nous avons, au cours des expériences décrites page 55, trouvé un Km dix fois plus faible à pH 8,5 qu'à pH 7,5, donc une affinité dix fois plus forte de l'enzyme pour la cynuramine. Par contre, V_{max} était seulement légèrement supérieur (9,45 mumôles.min^{-1}.mg^{-1} au lieu de 8,26).

Le maximum d'activité de l'amine-oxydase se situe dans une région de pH proche de celle où la protéine commence à se dénaturer (figure 17, 18 et 19). C'est une des raisons pour lesquelles on préfère doser l'enzyme à des pH allant de 7,4 à 7,7. On perd 30 à 50 % de sensibilité mais on a l'avantage de travailler à des pH plus "physiologiques". D'autre part, certaines amines sont instables aux pH alcalins. Quant au rôle possible de l'ionisation des sites de l'amine-oxydase, le problème est complexe et nécessiterait une étude complète de la variation de V_{max} et de K_m en fonction du pH. Ce que nous avons mis en évidence pour l'instant, c'est l'importance de l'ionisation du substrat et si nous revenons au problème, antérieurement abordé, de l'inhibition par excès de substrat, l'existence de deux formes du substrat : ionisée et non ionisée, peut fournir la base d'une interprétation du

phénomène. La cynuramine ionisée serait le seul substrat de l'enzyme alors que la forme non ionisée capable cependant de se fixer, serait l'inhibiteur compétitif. On doit alors s'attendre à ce que l'inhibition par excès de substrat disparaisse pour les pH où presque toute la cynuramine se trouve sous forme ionisée. Il existe des indications qui confirment ce point de vue. (MAC EWEN et coll., 1966).

Ce phénomène présente à nos yeux un grand intérêt théorique. Nous l'étudions actuellement dans les mitochondries de cerveau et de foie de rat qu'il est possible de préparer facilement ce qui n'est pas le cas pour le cerveau humain. Nous espérons cependant pouvoir reprendre l'étude de ce dernier et y mettre en évidence ce que nous croyons être un caractère général de la nonoamine-oxydase.

En ce qui concerne la variation de la vitesse initiale en fonction de la température d'incubation le maximum d'activité se situe à 45° C comme nous l'avons vu (figures 20, 21 et 22). La protéine est thermolabile au dessus de cette valeur. Le mode de représentation d'ARREHNIUS nous a permis d'estimer l'énergie d'activation du complexe ES. L'action de la température sur l'activité des enzymes est un phénonène complexe et d'interprétation difficile. Elle fait intervenir la stabilité de la protéine et du substrat, les variations de pH du milieu et de pK des réactifs, le démasquage d'activateurs ou d'inhibiteurs éventuels. Il est cependant possible, à la suite d'ARRHENIUS d'établir une relation entre la température à laquelle se déroule une réaction et la vitesse de cette réaction. Il faut pour cela supposer que ne peuvent réagir entre elles que des molécules "activées". On voit qu'il existe alors dans le milieu réactionnel un équili-

bre entre ces molécules et celles qui sont à l'état normal. Par molécule activée il faut entendre une molécule ayant atteint le niveau d'énergie qui lui permet d'entrer dans la réaction considérée, ici la désamination oxydative de la cynuramine par la monoamine-oxydase. On peut alors établir une relation entre la constante d'équilibre de la réaction et la température. Cette relation a la forme de l'expression de VAN t'HOFF qui pour une réaction chimique exprime la relation entre la constante d'équilibre K et la température absolue T,

soit : $$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{Q}{2 T^2} \qquad V\ 9$$

Q est la quantité de chaleur nécessaire pour faire passer une molécule, de sa forme normale, à sa forme activée. L'équation d'ARRHENIUS s'écrit

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{Q}{2 T^2} \qquad V\ 10$$

ou sous sa forme intégrée

$$k = A e^{-\frac{Q}{2 T}} \qquad V\ 11$$

k étant la constante de vitesse de la réaction, et A une constante d'intégration dont la nature est l'objet d'opinion divergentes de la part des thermodynamiciens.

Les expériences rapportées page 59 et suivantes montrent que pour la monoamine-oxydase des mitochondries de cerveau humain il y a deux relations linéaires (figure 23), l'une entre 20 et 30° C correspond à une énergie d'activation de 23,7 k Calories par mole de cynuramine et l'autre entre 30 et 40° C correspondant à 11,65 k Cal.mole^{-1}. On peut interpréter ce phénomène en disant que sous l'influence de la variation de température la molécule subit une déformation et que le passage entre les 2 formes se situe vers 30° C. La valeur de 11,65 k Cal.mole^{-1} est tout à

fait dans les normes puisque pour la plupart des enzymes elle est d'environ 10 k Cal.mole^{-1}. Pour les hydrolases, elle est souvent de 11 k Cal.mole^{-1}. Pour le foie et le rein, les valeurs sont, rappelons-le de 10,7 et 10,3 k Cal. par mole. respectivement.

L'étude de la spécificité des substrats et des deux inhibiteurs essayés identifie l'enzyme isolé à partir du cerveau à la catégorie EC 1.4.3.4. Il n'attaque pas l'histamine ce qui le différencie de l'histaminase de BEST (1929), ni la spermine et la spermidine ce qui le distingue de la spermine-oxydase de TABOR et coll., (1954), ni la putrescine, et la cadavérine, à la différence des diamine-oxydases. L'absence d'activité vis-à-vis de l'histamine est à rapprocher du résultat, également négatif, rapporté par PUGH et QUASTEL (1937 b) pour le cerveau de rat. Par contre, l'enzyme catabolise les arylalkylamines et les indolalkylamines, en particulier la sérotonine ce qui est en accord avec nos conceptions actuelles sur le rôle de l'amine-oxydase au niveau du système nerveux central (14). Rappelons que c'est UDENFRIEND qui le premier a démontré que l'acide 5-hydroxy-indolacétique de l'urine de certains mammifères - en particulier de l'homme - était le résultat du catabolisme de la sérotonine par l'amine-oxydase. Comme nous l'avons signalé page 6, l'aldéhyde formé est transformé en acide par l'aldéhyde déshydrogénase.

On peut cependant s'étonner de la faible activité de la MAO du système nerveux vis-à-vis de l'adrénaline et de la nor-adrénaline. WEINER (1960 b) trouve que l'adrénaline est oxydée 5 fois moins vite que la tyramine et la nor-adrénaline 3 fois moins vite. Dans le cas de l'enzyme de NAGATSU (1960) le substrat

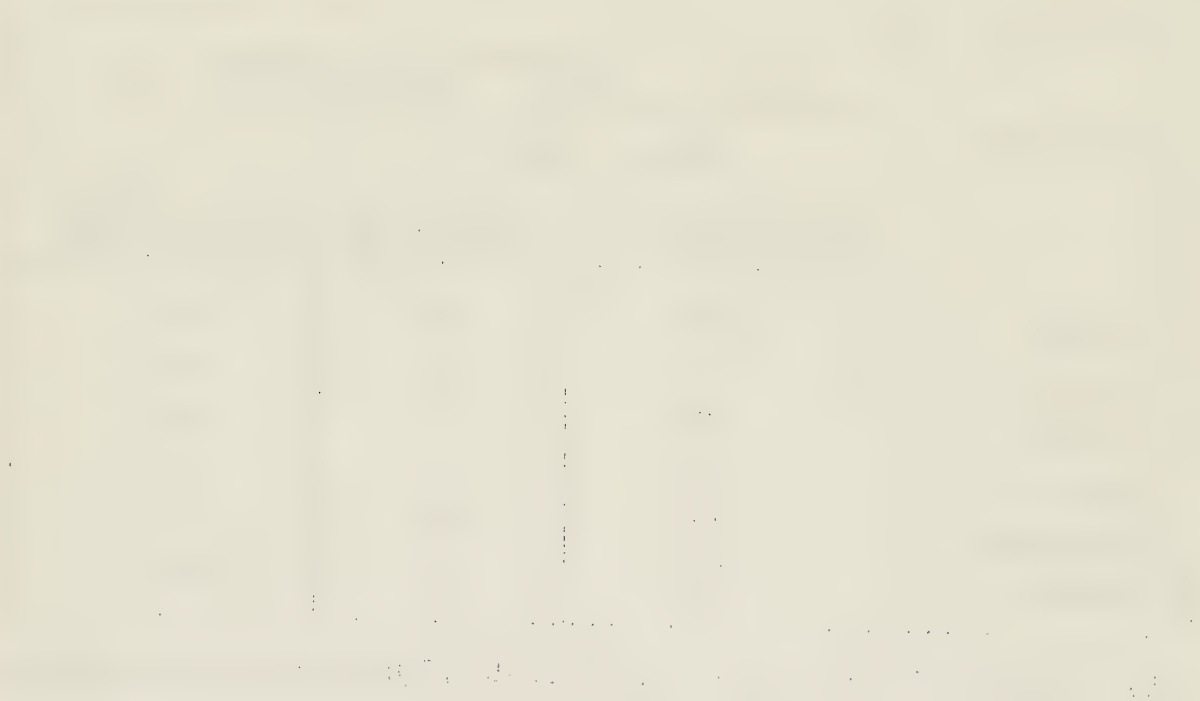
le plus actif est la tryptamine, et l'adrénaline et la nor-adrénaline sont métabolisées respectivement 8 et 5 fois moins vite. Dans notre cas (tableau XI) l'adrénaline et la nor-adrénaline sont oxydées 33 et 16 fois moins vite que la sérotonine. La question qui se pose immédiatement est de savoir s'il en est de même in vivo. Cela semble peu probable à la lumière des connaissances actuelles et on peut attribuer la divergence au fait que dans les expériences in vitro l'adrénaline et la nor-adrénaline se transforment non enzymatiquement en produits d'oxydation - en particulier adrénochrome et nor-adrénachrome - qui échappent à l'action de l'amine-oxydase.

Lorsqu'on compare les résultats du Tableau XI à ceux publiés par WEINER (1960 b) - et qui sont à notre connaissance les seuls concernant le cerveau humain - on note certaines différences. WEINER utilise comme source d'enzyme une fraction mitochondriale brute, très impure, correspondant à peu près à notre fraction M_b. Les mitochondries sont dialysées et l'amine oxydase est dosée par manométrie. Le Tableau XII compare les résultats ainsi obtenus avec nos propres données.

TABLEAU XII.

SUBSTRAT	VITESSE D'OXYDATION VALEURS RELATIVES. LE SUBSTRAT LE PLUS ACTIF = 100 (1)		
	WEINER(1960 b)	TABLEAU XI	NAGATSU(1966)
Tyramine	100	78	81
Dopamine	83	31	61
Noradrénaline	30	6	22
Adrénaline	22	3	12
Sérotonine	20	100	93
Tryptamine	14	93	100

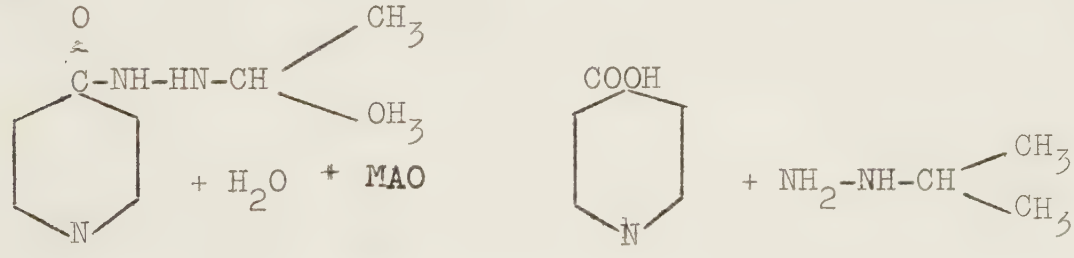
(1) Chaque chiffre est la moyenne de plusieurs déterminations, 3 dans notre cas.



On voit que l'enzyme de WEINER oxyde la tyramine cinq fois plus vite que la sérotonine alors que le notre oxyde cette dernière, 1,3 fois plus vite que la tyramine. Nos résultats sont par contre, en accord avec ceux de NAGATSU (1966) qui concernent le cerveau de boeuf, son enzyme est purifié 6 fois.

Enfin, l'étude des deux IMAO amène une intéressante confirmation. L'iproniazide, employée dans les état dépressifs (FRAZIER et FAUCETT, 1959, HAWKINS et coll., 1959) agirait en inhibant l'amine-oxydase cérébrale (LOOMER et coll., 1957). Depuis son énoncé, cette hypothèse a reçue plusieurs confirmations. On a montré que l'iproniazide traverse la barrière hématoméningée (HESS et coll., 1958, NAIR et coll., 1960). Chez le rat, elle inhibe, in vitro, l'amine-oxydase des mitochondries de cerveau (SEIDEN et WESTLEY, 1963). Dans le cerveau humain, l'effet inhibiteur se manifeste dès la concentration de 10^{-3} M. Nous pensons, pour conclure, que l'enzyme cible des IMAO est bien celui que nous avons partiellement purifié. C'est à son contact, en particulier, que l'iproniazide est hydrolysé en acide isonicotinique et isopropyl hydrazine qui est le véritable agent pharmacologique.

Selon SEIDEN et WESTLEY (1963), les réactions s'écrivent :



V 12

$NH_2-NH-CH(CH_3)-CH_3$ + MAO ⟶ MAO inactive

V 13

V 13

Aucune de ces deux réactions ne serait réversible (SEIDEN et WESTLEY, 1963). La préincubation de 15 minutes à 37° C (page 64) est nécessaire pour que les réactions V 12 et V 13 soient complètes. L'ensemble se comporte comme une réaction d'ordre 1. Dans le cas de l'amine-oxydase des mitochondries de foie de rat DAVISON (1957) a calculé que l'énergie d'activation nécessaire à la fixation est élevée : 30 kCal, au lieu de 17 pour la formation du complexe enzyme-tyramine.

La trans-phényl cyclopropylamine a été découverte dans les laboratoires SMITH, KLINE et FRENCH sous le nom de SKF 385 (TEDESCHI et coll., 1959). C'est un puissant inhibiteur de la monoamine-oxydase dont l'action n'est pas inversée par dialyse. Ces données sont en parfait accord avec nos résultats.

Il est également classique de ne trouver aucun effet inhibiteur de la part du cyanure de potassium non plus que des réactifs du groupement carbonyl tel que la semicarbazide. Il s'agit là de caractères différentiels avec le groupe des diamines oxydases, qui ont servis de base à ZELLER (1940, 1941) pour introduire la distinction entre les deux familles d'enzymes. Enfin, l'absence d'inhibition avec l'EDTA ou la cystéine ne permettent pas de conclure à l'existence d'un centre actif sans métal, d'autant que toutes les amine-oxydases purifiées jusqu'ici renferment du cuivre. (NARA et coll., 1966).

On ne connaît à l'heure actuelle aucun activateur de l'amine-oxydase. PERRY et coll., (1955) ont rapporté l'activation de la MAO par un certain nombre de cations, en particulier le Vanadium, sous forme d'ion vanadyle : VO^{++}. L'activité de l'enzyme, mesurée par la quantité d'oxygène consommée en présence de tryptamine, est augmentée, selon ces auteurs, de 125 %

pour une concentration de 10^{-2} M en VO^{++}. En utilisant une méthode spectrophotométrique plus spécifique (WEISSBACH et coll., 1960) nous n'avons pas retrouvé l'effet cité (AMAR-COSTESEC et coll., 1966). Il est probable que la consommation d'oxygène observée par PERRY était dûe à l'oxydation catalytique de l'amine par les cations. MARTIN et coll., (1966) ont d'ailleurs montré l'oxydation, en milieu tamponné, de la tryptamine par le vanadium. In vivo, il n'a pas été possible de mettre en évidence une stimulation de la MAO par le métavanadate de sodium (LEWIS, 1959), ce qui s'inscrit contre l'opinion de SCHROEDER (1960) qui, d'après les résultats de PERRY et coll., (1955), avait avancé l'hypothèse que le vanadium pouvait être le co-facteur de la MAO. On sait que ce métal a été mis en évidence dans les tissus végétaux et animaux par Gabriel BERTRAND puis par Didier BERTRAND. Il semble bien, finalement, que le vanadium ne puisse pas être considéré comme un co-facteur ou un activateur de l'amine-oxydase.

CONCLUSIONS

Cette thèse décrit les méthodes employées pour obtenir la purification partielle de l'amine-oxydase (E.C. 1.4.3.4.) enzyme de la paroi externe des mitochondries. Un enrichissement de 20 fois par rapport à l'homogénat tissulaire initial a été obtenu pour le cerveau humain. Ce résultat marque un progrès par rapport à celui de NAGATSU (1966) qui rapporte pour le cerveau de boeuf une augmentation d'activité de 6 fois. Ce progrès est dû à l'emploi d'un gradient discontinu de densité pour obtenir une fraction mitochondriale purifiée (M_p) à partir de laquelle l'enzyme est solubilisé et chromatographié. La difficulté qui reste à surmonter pour obtenir des purifications, plus complètes est le fait que l'amine-oxydase s'inactive en solution diluée. Il n'est cependant pas nécessaire d'avoir des préparations très pures pour comparer des enzymes d'origines différentes. Il nous semble, par contre, essentiel de ne comparer entre elles que des préparations au même stade d'enrichissement.

L'objet de notre travail est une étude comparée de l'amine-oxydase du cerveau, du foie et du rein, chez l'homme. Nous voulons démontrer que l'enzyme cérébral - auquel a été attribué la fonction précise d'inactiver les médiateurs chimiques, catécholamines et sérotonine - est différent de celui qu'on trouve dans le foie et le rein. Selon nous, des différences dans la cinétique de désamination reflètent des différences de structure et de spécificité vis-à-vis des substrats se traduisant au niveau cellulaire par des rôles physiologiques différents.
Le tableau XIII résume les résultats de cette étude.

TABLEAU XIII.

Organe considéré.	Activité spécifique dans un homogénat tissulaire.	Localisation subcellulaire.	Enrichissement maximum obtenu.	K_m en Moles par litre.	Inhibition par excès de substrat.	Vmax en mμM de 4 hydroxy-quinoléine formées par min. par mg. de protéine.
Cerveau	0,33±0,04	mitochondries ... seulement (?)	20 fois	$4,3.10^{-5}$	non	8,26
Foie	3,70±0,44	mitochondries et microsomes	50 fois	$1,05.10^{-4}$	oui	76,92
Rein	2,43±0,50	mitochondries et microsomes	10 fois	$1,25.10^{-4}$	oui	72,63

Etude comparée de l'amine-oxydase de cerveau, de foie et de rein chez l'homme.
Substrat utilisé : Cynuramine.

TABLEAU XIII (suite)

Organe considéré.	Valeurs de pH entre lesquelles l'activité de l'enzyme est maximum.	Stabilité de l'amine-oxydase aux pH. élevés.		Chaleur d'activation en k Cal. par Môle du complexe enzyme substrat entre 20 et 40° C.		Température en °C pour laquelle l'activité de l'enzyme est maximum	Existence dans la courbe de variation de l'activité en fontion de la température d'un deuxième sommet à 28° C.	Substrat attaqué par l'amine oxydase avec la vitesse la plus élevée.
		Vit. à pH 10,5 x 100 / Vit. à pH 9	Vit. à pH 10 x 100 / Vit. à pH 9	entre 30 et 40° C.	entre 20 et 30° C.			
Cerveau	entre 8 & 9,2	0%	63%	11,7	23,7	45	non	sérotonine
Foie	entre 8,9 & 9,9	26%	84,6 %	10,7	20,7	45	oui	tyramine
Rein	entre 8,9 & 9,5	50%	82,1 %	10,3	10,3	45	oui	tyraminr

Etude comparée de l'amine-oxydase de cerveau, de foie et de rein chez l'homme.
Substrat utilisé : Cynuramine.

Les différences entre le foie et le rein d'une part, et le cerveau, d'autre part, nous semblent suffisamment marquées pour être compatibles avec des fonctions séparées au niveau cellulaire, surtout si l'on tient compte du fait que le foie et le rein, qui sont beaucoup plus riches que le cerveau en amine-oxydase, ne contiennent que de très faibles quantités de catécholamines et de sérotonine. Il faut considérer les amine-oxydases comme une famille d'enzymes dont les membres ont des fonctions variant avec les organes : au sein du tissus nerveux et sympathique, nous avons vu ce qu'il en était, au sein de l'intestin grêle, inactivation des amines hypertensives, au niveau du foie et du rein, inactivation d'amines endogènes ou exogènes possédant des potentialités toxiques vis-à-vis de certains métabolismes cellulaires. C'est, du moins, notre théorie, et il nous faut maintenant trouver les substrats incriminés et montrer, d'une part qu'ils sont toxiques vis-à-vis de mécanismes essentiels et, d'autre part, que l'enzyme est capable de s'opposer à cette action.

Nous espérons pouvoir démontrer qu'à côté du système enzymatique microsomial métabolisant les drogues, les stéroïdes et les cancérogènes la cellule hépatique possède une seconde barrière de protection, le système de désamination oxydative dont le site d'action est la membrane externe des mitochondries.

BIBLIOGRAPHIE

ALLES, G.A., et HEEGARD, E.V. (1943).
J. Biol. Chem., 147, 487
Substrate specificity of amine oxidase.

AMAR-COSTESEC, A. (1966).
Rev. Franç. Et. Clin Biol., 11, 925.
Solubilisation de l'amine-oxydase mitochondriale par l'emploi de sons ou d'ultra-sons.

AMAR-COSTESEC, A., et BOHUON , C. (1965).
Rev. Franç. Et. Clin. Biol., 10, 746.
Données expérimentales sur la préparation de la monoamine oxydase de foie de cobaye.

AMAR-COSTESEC, A., BOHUON, C., et SCHWEISGUTH, O. (1965).
Europ. J. Cancer, 1, 225.
Activité monoamine-oxydase dans les tumeurs de la crête neurale.

AMAR-COSTESEC, A., TRUHAUT, R. et BOHUON, C. (1966)
Ann. Biol. Clin., 24, 463.
Etude de l'influence du métavanadate de sodium sur la monoamine-oxydase.

APPELMANS, F., WATTIAUX, R. et de DUVE C. (1955).
Biochem. J., 59, 438.
Tissue fractionation studies. V The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver.

BARBATO, L.M., et ABOOD, L.G. (1963).
Biochem. Biophys. Acta, 67, 531.
Purification and properties of monoamine oxidase.

BARSKY, J., BERMAN, E.R. et ZELLER, E.A. (1953).
Abstr. Communs 19th Intern. Physiol. Congr., p. 191.
On the solubilization and inhibition of monoamine oxidase.

BAUDHUIN, P., BEAUFAY, H., RAHMAN-LI, Y., SELLINGER, O.Z., WATTIAUX, R., JACQUES, P., et de DUVE, C. (1964).
Biochem. J., 92, 179.
Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate amino transferase, alanine amino transferase, D amino acid oxidase and catalase in rat liver tissue.

BEST, E.H. (1929).
J. Physiol., 61, 256.
The disappearance of histamine from autolysing lung tissue.

BIRKHAUSER, H. (1941).
Schweiz. Med. Wschr., 71, 750.
Cholinesterase und Mono Aminoxydase in zentralen Nerveussystem.

BLACKWELL, (1963).
Lancet, II, 849.
Hypertensive crisis due to monoamine oxidase inhibition.

BLACKWELL, B., et MABBITT, L.A. (1965).
Lancet, I, 938.
Tyramine in cheese related to hypertensive crisis after monoamine oxidase inhibition.

BLASCHKO, H. (1941).
J. Physiol., 99, 364.
Amine oxidase in Sepia officinalis.

BLASCHKO, H. (1952).
Pharmacol. Revs., 4, 415.
Amine oxidase and amine metabolism.

BLASCHKO, H. (1963).
Amine oxidase, in BOYER, LARDY, MYRBACK.
The Enzymes, Vol. VIII, P. 337.
Academic Press, New-York - Londres.

BLASCHKO, H., COLHOUN, E.H., et FRONTALI, N. (1961).
J. Physiol., 156, 28 P.
Occurence of amine oxidase in an insect, Periplaneta americana L.

BLASCHKO, H., et HAWKINS, J. (1952).
J. Physiol. 118, 88.
Observations on amine oxidase in cephalopods.

BLASCHKO, H., et HIMMS, J.M. (1953).
J. Physiol., 120, 445.
Amine oxidase in the earthworm.

BLASCHKO, H., et HIMMS, J.M. (1954).
J. Exptl. Biol., 31, 1.
Enzymic oxidation of amines in decapods.

BLASCHKO, H., RICHTER D., et SCHLOSSMANN, H. (1937 a).
J. Physiol., 90, 1.
The inactivation of adrenaline.

BLASCHKO, H., RICHTER, D. et SCHLOSSMANN, H. (1937 b).
Biochem. J., 31, 2187.
The oxidation of adrenaline and other amines.

BOGDANSKI, D.F., WEISSBACH, H., et UDENFRIEND, S. (1957).
J. Neurochem., 1, 272.
The distribution of serotonin, 5 hydroxy trypophan decarboxylase and monoamine oxidase in brain.

BOVET, D., et BOVET-NITTI, F. (1948).
Médicaments du systène nerveux végétatif.
S'KARGER, Bâle.

BRODIE, B., et BEAVEN, M.A. (1963).
Med. exp. 8, 320.
Neurochemical transducer systems.

BUFFONI, F., et BLASCHKO, H. (1965).
Proc. Roy. Soc., 161, 153.
Benzylamine oxidase and histaminase : purification and crystallization of an enzyme of pig plasma.

BURKARD, W. (1954).
Contribution à l'étude de l'histaminase.
Foulon, R. Paris.

BURKARD, W.P., GEY, K.F., et PLETSCHER, A. (1963).
J. Neurochem., 10, 183.
Diamine oxidase in the brain of vertebrates.

COQ, M.H., et BARON, C. (1964).
Exper, 20, 374.
Solubilisation de la monoamine oxydase des mitochondries de foie de rat.

COTZIAS, G.C. et DOLE, V.P. (1952).
J. Biol. Chem., 196, 235.
The activity of histaminase in tissues.

COTZIAS, G.C., SERLIN, I., et GREENOUGH, J.J. (1954).
Science, 120, 144.
Preparation of soluble monoamine oxidase.

CREASEY, N.H. (1956).
Biochem. J. 64, 178.
Factors which interfere in the manometric assay of monoamine oxidase.

DAVISON, A.N. (1957).
Biochem. J., 67, 316.
The mechanism of the irreversible inhibition of rat-liver monoamine oxidase by iproniazid (Marsilid).

de DUVE, C. et BERTHET, J. (1953).
Nature, 172, 1142.
Reproducibility of differential centrifugation experiments in tissue fractionation.

de DUVE, C., BEAUFAY, H., JACQUES, P. RAHMAN-Li, Y., SELLINGER, OZ, WATTIAUX, R., et de CONINCK, S. (1960).
Biochim. Biophys. Acta, 40, 186.
Intracellular localization of catalase and of some oxydases in rat liver.

de DUVE, C., WATTIAUX, R., et BAUDHUIN, P. (1962).
Adv. in Enzymol., 24, 291.
Distribution of enzymes between subcellular fractions in animal tissues.

ELEFTHERIOU, B.E. et BOEHLKE, K.W. (1967).
Science, 155, 1693.
Brain monoamine oxidase in mice after exposure to agression and defeat.

EWINS, A.J. et LAIDLAW, P.P. (1910).
J. Physiol., 41, 78.
The fate of p-hydroxy phenylethylamine in the organism.

EWINS, A.J., et LAIDLAW, P.P. (1913).
Biochem. J., 18, 7.
The fate of indol ethylamine in the organism.

FISCHER, A.G., SCHULZ, A.R., et OLINER, L. (1966).
Life Sci., 5, 995.
The possible role of thyroid monoamine oxidase in iodo thyronine synthesis.

FISHMAN, W.H., KATO, K., ANSTISS, C.L., et GREEN, S. (1967).
Clin. Chim. Acta, 15, 435.
Human serum glucuronidase; its measurement and some of its properties.

FRAZIER, S.M., et FAUCETT, R.L. (1959).
Ann. NY. Acad. Sci., 80, 754.
The usefulnen of amine oxidase inhibition in psychiatry.

FULLER, R.W., et WALTERS, C.P. (1965).
Biochem. Pharmacol., 14, 159.
Inhibition of monoamine oxidase action on kynuramine by substrate amines and stereo isomeric α methyl amines.

GABAY, S., VALCOURT, A., et MAC KEEN, D. (1966).
Fed. Proc., 25, 319.
Preparation of highly-purified liver monoamine oxidase (MAO).

GLENNER, G.G., BURTNER, H.J., BROWN, G.W. (1957).
J. Histochem. Cytochem., 5, 591.
The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by tetrazolium salts.

GORKIN, V.Z. (1963).
Nature, 200, 77.
Partial separation of rat liver mitochondrial amine oxidases.

GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J., et DAVID, M.M. (1949).
J. Biol. Chem., 177, 751.
Determination of serum proteins by mean of the biuret reaction.

GORYACHENKOVA, E.V., et ERSHOVA, E.A. (1963).
Chemical and Biological aspects of pyridoxal catalysis, Pergammon Press, p. 447.

GREEN, H., et ERICKSON, R.W. (1962).
Arch. Int. Pharm. Ther., 135, 407.
Further studies with tranylcypromine (monoamine oxidase inhibitor) and its interaction with reserpine in rat brain.

GUGGENHEIM, M., et LOFFLER, W. (1916).
Biochem. Ztschr. 72, 325.
Das Schicksal proteinogener Amine in Tierkörper.

GUHA, S.R., et KRISHNA MURTI, C.R. (1965).
Biochem. Biophys. Res. Comm., 18, 350.
Purification and solubilization of monoamine oxidase of rat liver mitochondria.

HARE, M.L.C. (1928)
Biochem. J., 22, 968.
Tyramine oxidase. I.A new enzyme system in liver.

HARRIS, E.S. (1960).
Fed. Proc., 19, 25.
Studies on rat liver monoamine oxidase.

HAWKINS, J. (1952).
Biochem. J., 50, 577.
The localization of amine oxidase in the liver cell.

HAWKINS, J.R., HILLARD, W.E., MOULTON, J.A.L. et FABING, H.(1959)
Ann. N.Y. Acad. Sci., 80, 745. The use of iproniazid in the treatment of depressive states.

HEBB, C.O., et WHITTAKER, V.P. (1958).
J. Physiol., 142, 187.
Intracellular distribution of acetyl choline and choline acetylase.

HESS, S.M., WEISSBACH, H., REDFIELD, B.G., et UDENFRIEND, S. (1958).
J. Pharmacol., 124, 189.
Relation between iproniazid metabolism and the duration of its effect on monoamine oxidase.

HOPE, D.B., SMITH, A.D., (1960).
Biochem. J., 74, 101.
Distribution and activity of monoamine oxidase in mouse tissues.

KALIMAN, P.A. (1965).
Biokhimiya, 30, 1194.
Role of mitochondrial monoamine oxidase of some rabbit organs in the oxidation of catechol amines and tyramine.

KAPPELER-ADLER, R., et MAC FARLANE, H. (1963).
Biochem. Biophys. Acta. 67, 542.
Purification and identification of hog kidney histaminase.

KENTEN, R.H., et MANN, P.J.G. (1952).
Biochem. J., 50, 360.
The oxidation of amines by extracts of pea-seedlings.

KLYASHTORIN, L.B., GRIDNEVA, L.I., et GORKIN, V.Z. (1966).
Biokhimiya, 31, 167.
Chromatographic purification and properties of rat mitochondrial monoamine oxidase.

KOHN, H.I. (1937).
Biochem. Pharmacol., 14, 1684.
A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase.

KRAML, M. (1965).
Biochem. Pharmacol., 14, 1684.
A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase.

LEVINE, R.J., et SJOERDSMA, A. (1962).
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 109, 225.
Monoamine oxidase activity in human tissues and intestinal biopsy specimens.

LEWIS, C.E. (1959).
A.M.A. Arch. Ind. Health., 20, 455.
The biological actions of vanadium. III. Effect of vanadium on the excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid and amino acids and on the electrocardiogram of the dog.

LINEWEAVER, H., et BURK, D. (1934).
J. Am. Chem. Soc., 56, 658.
The determination of enzyme dissociation constants.

LOOMER, H.P., SAUNDERS, J.C., et KLINE, N.S. (1957).
Am. Psychiatr. Assoc. Res. Rep., 8, 129.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., et RANDALL, R.J. (1951)
J. Biol. Chem., 193, 265.
Protein measurement with the Folin phenol reagent.

MAC EWEN, C.M. Jr.,(1965 a).
J. Biol. Chem., 240, 2003
Human plasma monoamine oxidase. I. Purification and identification.

MAC EWEN, C.M. (1965 b).
J . Biol. Chem., 240, 2011
Human plasma monoamine oxidase. II. Kinetic studies.

MAC EWEN, C.M. Jr., CULLEN, K.T., et SOBER, A. J. (1966).
J. Biol. Chem., 241, 4544.
Rabbit serum monoamine oxidase. Purification and characterization.

MAKINO, K., SATOH, K., et JOH, Y. (1955).
J. Biochem. (Japan), 42, 555.
Conversion of kynurenamine to kynurine by mouse liver homogenate.

MANN, P.G.J. (1955).
Biochem. J., 59, 609.
Purification and properties of the amine oxidase of pea seedlings.

MANN, P.J.G. (1960).
Biochem. J., 76, 44 P.
Further purification and properties of the amine oxidase of pea seedlings.

MARTIN, G.M., BENDITT, E.P. et ERIKSEN, N. (1960).
Nature, 186, 884.
Vanadium catalysis of the oxidation of catecholamines, dihydroxyphenylalamine, and 5 hydroxyindoles.

MASAI, H., KUSUNOKI, T., et ISHIBASHI, H. (1965).
Experientia, 21, 572.
A histochemical study on the fundamental plan of the central nervous system.

MASON, H S. (1957).
Adv. in Enzymol, 19, 79.
Mechanisms of oxygen metabolism.

MELLANBY, E. et TWORT, F.W. (1912)
J. Physiol., 45, 53.
On the presence of imidazolethylamine in the intestinal wall; with a method of isolating a bacillus from the alimentary canal which converts histidine into this substance.

MELNYKOWYCZ, J. et JOHANSSON, K.R., (1955).
J. Exp. Med., 101, 507.
Formation of amines by intestinal microorganisms and the influence of chlortetracycline.

MINKOWSKI, O. (1883).
Arch. exper. Path. Pharmakol., 17, 445.
Uber Spaltungen in Thierkörper.

MONDOVI, B., ROTILLO, G., FINAZZI, A., et SCIOSCIA-SANTORO, A. (1964).
Biochem.J., 91, 408.
Purification of pig-kidney diamine oxidase and its identity with histaminase.

MOSSO, U. (1889)
Arch. exper. Path. Pharmakol., 26, 267.
Quantitative Untersuchungen über die Ausscheidung der Salicylsäure und der Umwandlungs produkte des Benzylamins aus den thierischen Organismus.

MURRAY, D.R.P. (1930).
Biochem. J., 24, 1890.
The inhibition of esterases by excess substrate.

NAGATSU, T.J. (1966).
Biochem. (Tokyo), 59, 606.
Partial separation and properties of mitochondrial monoamine oxidase in brain.

NAIR, V., HANAGREN, A., LAL, H., et ROTH, L.J. (1960).
Fed. Proc., 19, 352.
Whole body antoradiography of C^{14} iproniazid in mouse.

NARA, S., GOMES, B., et YASUNOBU, K.T. (1966).
J. Biol. Chem., 241, 2774.
Amine oxidase. VII. Beef liver mitochondrial monoamine oxydase, a copper containing protein.

NARA S., IGAUE, I., GOMES, B., et YASUNOBU, K.T. (1966).
Biochem., Biophys., Res. Comm., 23, 324.
The prosthetic groups of animals amine oxidases.

O'STEEN, W.K., et CALLAS, G. (1964).
Anat. Rec., 150, 257.
Histochemical study of monoamine oxidase in central nervous system cultures.

O'STEEN, W.K., et DILL, R.E. (1964).
J. Histochem. Cytochem., 12, 615.
Intracellular monoamine oxidase and lipids in diffusion chamber cultures of the pineal organ.

OSWALD, E.O., et STRITTMATTER, C.F. (1963).
Proc.Soc. Exp. Biol. Med., 114, 668.
Comparative studies in the characterization of monoamine oxydases.

OTSUKA, S., et KOBAYASHI, Y. (1964).
Biochem. Pharmacol., 13, 995.
A radio isotopic assay for monoamine oxidase determinations in human plasma.

PARSONS, D.F., WILLIAMS, G.R. et CHANCE, B. (1966).
Ann. N.Y. Acad. Sci., 137.
Characteristics of isolated and purified preparations of the outer and inner membranes of mitochondria.

PERRY, H.M. Jr., TEITLEBAUM, S. et SCHWARTZ, P.L. (1955).
Fed. Proc., 14, 113.
Effects of antihypertensive agents on amino acid decarboxylation and amine oxidation.

PUGH, C.E.M., et QUASTEL, J.H. (1937 a).
Biochem. J., 31, 286.
Oxidation of aliphatic amines by brain and other tissues.

PUGH, C.E.M., QUASTEL, J.H. (1937 b).
Biochem. J., 31, 2306.
Oxidation of amines by animal tissues.

RICHTER, D., (1937).
Biochem. J., 31, 2022.
Adrenaline and amine oxidase.

RUSSEL, J.A. (1944).
J. Biol., Chem., 156, 457.
The colorimetric estimation of small amounts of ammonia by the phenol-hypochlorite reaction.

SCHMIEDEBERG, O. (1877).
Arch. exper. Path. Pharmakol., 8, 1.
Uber das Verhältriss des Ammoniaks und der primären Monoaminbasen zur Harstoffbildung in Thierkörper.

SCHMIEDEBERG, O. (1881).
Arch. exper. Path. Pharmakol., 14, 379.
Uber Spaltungen und Synthesen in Thierkörper.

SCHNAITMAN, C., ERWIN, V.G., et GREENAWALT, J.W. (1967).
J. Cell. Biol., 32, 219.
The submitochondrial localization of monoamine oxidase. An enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria.

SCHROEDER, H.A. (1960).
In Metal binding in medicine
Lippincott, Philadelphie.

SEIDEN, L.S., et WESTLEY, J. (1963).
Arch. Int. Pharmacodyn., 146, 145.
Mechanism of iproniazid inhibition of brain monoamine oxidase.

SELIGSON, D. et HIRAHARA, K. (1957).
J. Lab. Clin. Med., 49, 962.
The measurement of ammonia in whole blood, erythrocytes, and plasma.

SHIMIZU, N., MORIKAWA, N., et OKADA, M.Z. (1959).
Z. Zellforsch, 49, 389.
Histochemical studies of monoamine oxidase of the brain of rodents.

SMITH, B.J. (1963).
Anat., 97, 81.
Monoamine oxidase in the pineal gland, neurohypophysis and brain of the albino rat.

SOEP, H. (1962).
The determination of monoamine oxidase activity, in Proceedings of the secon International Symposium of Enzymes in Clinical Chemistry, p. 481, Butterworths, Londres.

STAHL, W.L., SMITH, J.C., NAPOLITANO, L.M., et BASFORD, R.E. (1963).
J. Cell. Biol., 19, 293
Brain mitochondria. I Isolation of bovine brain mitochondria.

TABOR, C.W., TABOR, H., et ROSENTHAL, S.M. (1954).
J. Biol. Chem., 208, 645.
Purification of amine oxidase of beef plasma.

TAKAGI, K., et GOMI, Y. (1966).
cités dans Chem. Abstr., 65, 9262.
Monoamine oxidase inhibitors. II Action of phenethylamine derivatives.

TEDESCHI, R.E., TEDESCHI, D.H., COOK, L., MATTIS, P.A., et FELLOWS, E.J. (1959).
Feder. Proced., 18, 451.
Some neuropharmacological observation on SKF trans 385 (2 phénylcyclo propylamine hydrochloride), a potent inhibitor of monoamine oxidase.

TEWARI, H.B., et BOURNE, G.H. (1963).
Acta Anat., 52, 334.
Histochemical studies on the distribution of monoamine oxidase in the cerebellum of rat.

TRUHAUT, R., AMAR-COSTESEC, A., et BOHUON, C. (1964)
Ann. Biol. Clin. 22, 1055.
Recherche d'une activité monoamine oxydase ou catéchol O-méthyl transférase dans le plasma de rats intoxiqués par le tétrachlorure de carbone.

UDENFRIED, S., BOGDANSKI, D.F., et WEISSBACH, H. (1957).
Metabolism of the nervous system. Ed. By E. RICHTER.
Pergamon Press, New-York, p. 569.

VALETTE, G., COHEN, Y. et BURKARD, W. (1956).
Pharm. Acta Helvet, 31, 282.
Répartition de l'histaminase dans différents organes de certains animaux.

WARBURG, O. (1948).
Werner Sciencer Press, Berlin.
Wasserstoff über trägende fermente.

WEINER, N.J., (1960) a
Neurochem., 6, 79.
The distribution of monoamine oxidase and succinic oxidase in brain.

WEINER, N. (1960) b
Arch. Biochem. Biophys., 91, 182.
Substrate specificity of brain amine oxidase of several Mammals.

WEISSBACH, H., SMITH, T.E., DALY, J.W., WITKOP, B. et UDENFRIEND, S.J. (1960).
J.Biol. Chem., 235, 1160.
A rapid spectrophotometric assay of Monoamine oxidase based on the rate of disappearance of kynuramine.

WERLE, E., TRAUTSCHOLD, I., et AURES, D. (1961).
Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem., 326, 200
Reinigung und Charakterisierung der Diamin oxydase aus Erbsen.

WHITTAKER, V.P. (1959).
Biochem. J., 72, 694.
The isolation and characterization of acetylcholine containing particles from brain.

WURTMAN, R.J., et AXELROD, J. (1963).
Biochem. Pharmacol., 12, 1439.
A sensitive and specific assay for the estimation of monoamine oxidase.

YAMADA, H., YASUNOBU, K.T. (1962).
J. Biol. Chem., 237, 1511.
Monoamine oxidase. I. Purification, crystalization and properties of plasma monoamine oxidase.

YOUDIM, M.B.H., et SOURKES, T.L. (1966).
Can. J. Biochem., 44, 1397.
Properties of purified soluble monoamine oxidase.

ZELLER, E.A. (1941).
Helv. Chim. Acta, 24, 539.

ZELLER, E.A. (1963).
Oxidation of Amines in J.B. SUMNER et K. MYRBACK.
The Enzymes Vol. II, part. I. p. 536, Academic Press, New-York.

ZELLER, E.A. (1963).
Diamine Oxidases in BOYER, P.D., LARDY, H., MIRBACK, K.
The Enzymes, Vol. VIII, p. 313, Academic Press, New-York.

ZELLER, E.A., et BARSKY, J. (1952).
Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 81, 459.
In vivo inhibition of liver and brain monoamine oxidase by 1 isonicotinyl 2 isopropyl hydrazine.

ZELLER, E.A., STERN, R., et WENK, M. (1940).
Helv. Chim. Acta, 23, 3.

ZOLOVICK, A.J., PEARSE, R., BOEHLKE, K.W., et ELEFTHERIOU, B.E. (1966).
Science, 154, 649.
Monoamine oxidase activity in various parts of the rat brain during the estrous cycle.